UNIVERSITE DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1950 — N° 33

La Recherche des Staphylocoques Pathogènes chez la Femme enceinte

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

présentée et soutenue publiquement en Mai 1950

PAR

Georges DESUSCLADE

DIPLOMÉ DU COURS DE PERFECTIONNEMENT
DE CHIMIE BIOLOGIQUE
DIPLOMÉ DE MICROBIOLOGIE

Membres du Jury

MM. ANDRIEU . . . *Président*
VALDIGUIÉ . . } *Assesseurs*
GUILHEM . . . }
Mme ENJALBERT . }
M. LAPORTE . . . *Suppléant*

TOULOUSE
IMPRIMERIE P. JULIA, 2, RUE TEMPONIÈRES

1950

Georges DESUSCLADE

La Recherche des Staphyloccques
Pathogènes chez la Femme enceinte

Toulouse. Imprimerie P. JULIA.
1950, in-8° (141 pages).

(*Thèse Médecine, Toulouse,* n° 33)

Georges DESUSCLADE

La Recherche des Staphylocoques
Pathogènes chez la Femme enceinte

Toulouse. Imprimerie P. JULIA.
1950, in-8° (141 pages).

(*Thèse Médecine, Toulouse,* n° 33)

Georges DESUSCLADE

La Recherche des Staphylocoques
Pathcgènes chez la Femme enceinte

Toulouse. Imprimerie P. JULIA.
1950, in-8° (141 pages).

(*Thèse Médecine, Toulouse,* n° 33)

Georges DESUSCLADE

La Recherche des Staphylocoques
Pathogènes chez la Femme enceinte

Toulouse. Imprimerie P. JULIA.
1950, in-8° (141 pages).

(*Thèse Médecine, Toulouse,* n° 33)

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548912_0054

La Recherche

des Staphylocoques Pathogènes

chez la Femme enceinte

UNIVERSITE DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1950 — N° 33

La Recherche des Staphylocoques Pathogènes chez la Femme enceinte

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

présentée et soutenue publiquement en Mai 1950

PAR

Georges DESUSCLADE

DIPLOMÉ DU COURS DE PERFECTIONNEMENT
DE CHIMIE BIOLOGIQUE
DIPLOMÉ DE MICROBIOLOGIE

Membres du Jury

MM. ANDRIEU .... *Président*
VALDIGUIÉ .. } *Assesseurs*
GUILHEM ... }
Mme ENJALBERT .
M. LAPORTE ... *Suppléant*

TOULOUSE
IMPRIMERIE P. JULIA, 2, RUE TEMPONIÈRES

1950

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

TABLEAU DU PERSONNEL

DOYEN. . . . . MM. LEFEBVRE.
ASSESSEUR. . . . . BRUSTIER.
Doyens honoraires. . . . . GORSE — CALVET.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. RISPAL — MM. LAFFORGUE — MM. MERIEL, CLERMONT, SERR. — GARIPUY, RIBAUT, VALLOIS.

PROFESSEURS

Clinique de neurologie et de psychiatrie	MM. RISER.
Clinique médicale	TAPIE, ROQUES.
Clinique obstétricale	GUILHEM.
Physiologie	SOULA.
Clinique chirurgicale et du Cancer	DUCUING.
Physique biologique et médicale	BUGNARD.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	NANTA.
Chimie et Toxicologie	BRUSTIER.
Pathologie générale et médecine expérimentale	SENDRAIL.
Clinique chirurgicale et gynécologie	LEFEBVRE.
Anatomie	LAZORTHES.
Histoire naturelle	DELAS.
Clinique médicale infantile et puériculture	SOREL. R.
Pharmacie	CAUJOLLE.
Pathologie interne. et Clinique des Maladies de la Tuberculose	MOREL.
Bactériologie, hygiène, médecine sociale	ANDRIEU.
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	VIRENQUE.
Clinique des maladies des voies urinaires	FABRE (P.).
Matière médicale	VINCENT.
Hydrologie thérapeutique et climatologie	MERIEL (P.).
Anatomie pathologique	FABRE (Jacques).
Clinique O. R. L. et de chirurgie maxillo-faciale	CALVET.
Clinique ophtalmologique	CALMETTES.
Chimie biologique	VALDIGUIÉ (P.)
Médecine légale et du Travail	PLANQUES.
Histologie et Embryologie	BROUSSY.
Médecine Sociale	BOUNHOURE
Thérapeutique	GADRAT
Pathologie Chirurgicale	GRIMOUD

PROFESSEUR SANS CHAIRE

Physiologie	MM. BAISSET.
Anatomie	COULOUMA.

MAITRES DE CONFERENCES AGRÉGÉS

Anatomie	MM. POULHÈS.
Histologie	BIMES.
Sciences naturelles	BOUISSET.
Pharmacie	COUTURIER.
Botanique	Mme DULUCQ-MATHOU.
Bactériologie	Mme ENJALBERT.
Chimie Biologique	MM. POLONOVSKI.
Physique médicale	AUVERGNAT.
Chimie générale pharmaceutique	BLANC.

AGRÉGÉS

Médecine	MM. DARNAUD, GÉRAUD, DARDENNE, LAPORTE (J.) BAUDOT.
Ophtalmologie	DEODATI.
Physique médicale	MARQUÈS.
Obstétrique	PONTONNIER.
Chirurgie	RIEUNAU. DIEULAFE. DAMBRIN (P.).
Odonto-Stomatologie	CADENAT.
Oto.Rhino-Laryngologie	CLAUX.

COURS COMPLÉMENTAIRES

Cours d'obstétrique aux élèves sages-femmes	MM. GUILHEM
Chimie biologique	DOUSTE-BLAZY.
Chimie pathologique	VALDIGUIÉ (P.).
Chimie minérale	BLANC.
Physique pharmaceutique	AUVERGNAT.
Dermatologie et Syphiligraphie	BAZEX.
Législation pharmaceutique	BOUISSET.
Microbiologie	BOUISSET.
Tuberculose	MOREL.
Chirurgie pulmonaire	DAMBRIN (P.)
Parasitologie	LASSERRE.
Cryptogamie	Mme DULUCQ-MATHOU.
Chimie analytique	MM. BLANC.
Hydrologie et géologie	ASTRE.
Anatomie médico-chirurgicale	THOMAS.
Pharmacodynamie. (Méd.)	BAISSET.
Pharmacodynamie (Pharm.)	CAUJOLLE.
Bactériologie et Hygiène	LAPORTE.
Urologie	LHEZ.
Ophtalmologie	DEODATI.
Neuro-chirurgie	LAZORTHES.
Oto-Rhino-Laryngologie	CLAUX.
Mycologie	MORQUER.
Physiologie	COLOMBIES.
Psychiatrie	GAYRAL

Secrétaire de la Faculté. : ARGILAS.

La Faculté déclare n'être pas responsable des opinions émises par les candidats.
(Délibération en date du 12 mai 1891.)

A LA MÉMOIRE DE MES GRANDS-PARENTS

A MA MÈRE

AU COLONEL DESUSCLADE, MON PÈRE

Officier de la Légion d'honneur,

Croix de Guerre 1914-1918.

A MON FRÈRE, DOCTEUR CLAUDE DESUSCLADE

A MES SŒURS

AUX MIENS

A MES AMIS

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR ANDRIEU

Chevalier de la Légion d'honneur.

Professeur de Bactériologie, Hygiène et Médecine Sociale,

Qui nous a fait le grand honneur de nous compter parmi ses élèves en nous inspirant ce travail.

En témoignage de profonde reconnaissance.

A NOTRE JURY DE THÈSE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR VALDIGUIÉ

Professeur de Chimie Biologique.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre sincère gratitude pour tout le bénéfice tiré de son enseignement.

MONSIEUR LE PROFESSEUR GUILHEM

Professeur de Clinique Obstétricale.

En hommage de reconnaissance pour l'accueil qu'il nous a toujours réservé dans son service.

MADAME LE PROFESSEUR AGRÉGÉ ENJALBERT

Maître de Conférences Agrégé de Bactériologie.

Nous tenons à lui exprimer ici toute notre reconnaissance et nos remerciements pour les conseils judicieux qu'elle nous a toujours si aimablement prodigués.

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ LAPORTE

En témoignage de reconnaissance.

A TOUS NOS MAÎTRES DE LA FACULTÉ ET DES HÔPITAUX :

A MONSIEUR LE DOCTEUR ESTIENNY

Chirurgien des Hôpitaux de Toulouse.

En témoignage de notre profonde gratitude.

A MONSIEUR LE DOCTEUR J. AVERSENQ

Chef de Travaux de Bactériologie.

A MONSIEUR LE DOCTEUR LEVRAT

Assistant de Bactériologie.

A NOTRE AMI,

MONSIEUR LE DOCTEUR JACQUES MONNIER

Chef de Clinique à la Faculté.

Nous le remercions bien vivement de l'aide et des conseils qu'ils nous a prodigués.

Introduction

L'étude clinique des staphylococcies dépend étroitement des recherches bactériologiques.

Pendant longtemps, la multiplicité des staphylocoques, leur pouvoir pathogène extrêmement variable, leur saprophytisme chez l'homme en faisaient accepter la découverte dans des lésions comme un signe d'une banalité trop grande pour être de quelque valeur.

Il a fallu que se multiplient et que se précisent les recherches de laboratoire pour que l'on puisse dresser le tableau clinique des staphylococcies. Le pouvoir du germe est double :

— virulence,

— pouvoir toxique.

Ces deux caractères, en s'intriquant avec les facteurs de défense individuelle, donnent un aspect clinique très particulier à toute la pathologie infectieuse staphylococcique.

Le siège habituel des staphylocoques est la peau, le rhinopharynx, la cavité buccale, certaines muqueuses chez l'homme sain.

L'application systématique de la recherche des caractères bactériologiques et sérologiques des staphylocoques dans les études épidémiologiques a conduit à des constatations assez inattendues.

Les recherches en milieu hospitalier ont montré que :

— Certains individus, ayant des antécédents staphylococciques mais sains en apparence, restaient porteurs, au niveau

de leurs fosses nasales, du germe même responsable de leurs anciennes lésions;

— Des sujets, chez lesquels on ne retrouve aucun antécédent staphylococcique, sont aussi porteurs sur leur muqueuse nasale de germes présentant tous les caractères des staphylocoques pathogènes.

L'intérêt de telles précisions dans la recherche et l'étude des staphylocoques est extrêmement grand, à un triple point de vue :

Bactériologique : Puisqu'il est possible de suivre parmi la flore si variée et banale des staphylocoques, les seuls de ces germes ayant une importance;

Epidémiologique : Puisque le fait de retrouver un staphylocoque pathogène chez des sujets en apparence sains permettra d'expliquer certaines épidémies en milieu hospitalier ou dans des collectivités et donnera la possibilité d'écarter le porteur de germes dangereux;

— *Clinique :* Puisque le portage de staphylocoques pathogènes serait à l'origine de bien des récidives ou des évolutions jusque là difficiles à expliquer.

Ce portage de germes staphylococciques a été étudié le plus souvent au niveau des fosses nasales. Notre Maître, M. le Professeur Andrieu, nous a conseillé de rechercher ce portage de staphylocoques pathogènes, parallèlement au niveau du vagin et du rhino-pharynx, en conduisant nos investigations dans un service de maternité, où les possibilités de recrutement sont plus grandes et les hospitalisées, en général, des personnes saines.

En effet, cette étude a rarement été réalisée et dans la littérature que nous avons pu consulter nous n'avons retrouvé que de rares statistiques concernant ce problème particulier. Seuls les auteurs intéressés par l'étude de la flore vaginale ou utérine ont mentionné la présence de staphylocoques sans poursuivre davantage l'étude des caractères de ces germes. A part

les recherches faites dans les infections du post-partum ou du post-abortum, seul Hite et ses collaborateurs ont étudié les staphylocoques chez les femmes enceintes : sur 248 femmes examinées, les pourcentages trouvés avant et après l'accouchement non compliqué sont de 6,0 et de 6,5 respectivement pour *Staphylococcus aureus*.

C'est pourquoi il nous a paru intéressant de rechercher les staphylocoques au niveau du vagin et du rhino-pharynx et d'étudier les caractères bactériologiques modernes des germes isolés en retenant les techniques d'utilité pratique et de mise en œuvre facile dans un laboratoire clinique.

Notre travail, poursuivi pendant trois mois, nous a permis d'examiner 231 femmes, de pratiquer 544 prélèvements et d'isoler 239 souches, dont 75 répondant aux caractères pathogènes définis par les travaux dont nous reprendrons l'exposé. D'autre part, toutes les souches de staphylocoques isolées ont été testées vis-à-vis d'antibiotiques.

La recherche des staphylocoques a été effectuée à l'Hôpital Saint-Joseph de la Grave, chez toutes les jeunes femmes qui sont entrées à la Clinique d'Accouchements (Service de M. le Professeur Guilhem) et à la Maternité (Service de M. le Docteur Estienny).

La partie bactériologique de ce travail a été faite au Laboratoire de Bactériologie et d'Hygiène de la Faculté de Médecine de Toulouse (Professeur Andrieu).

Dans une *première partie*, nous exposerons les caractères des staphylocoques, en insistant sur les données bactériologiques modernes.

Dans une *deuxième partie*, consacrée à nos travaux personnels, nous envisagerons successivement les techniques d'étude, les résultats bactériologiques, l'action des antibiotiques sur les souches isolées et une tentative d'interprétation des résultats obtenus.

PREMIÈRE PARTIE

LES STAPHYLOCOQUES

Il est intéressant d'opposer dans l'étude bactériologique des staphylocoques les *travaux classiques* aux *données modernes* apportées par les recherches récentes.

Caractères Classiques

Les caractères classiques des staphylocoques ont été définis dès les premiers travaux bactériologiques et ils sont parfaitement exposés dans tous les traités classiques. Nous en rappelerons simplement les principaux.

Ces germes ont été étudiés simultanément par PASTEUR, en France, et, à l'étranger, OGSTON, ROSENBACH, de 1878 à 1884.

Actuellement, ils sont classés comme faisant partie, dans la classe des Eubactériales de la famille des *Micrococcacceæ*. Cette famille comprend plusieurs tribus. Deux seulement nous intéresseront au cours de ce travail :

— Les Staphylocoques (*Staphylococceæ* PRÉVOT) ;

— Les Microcoques (*Micrococceæ* PRÉVOT).

Les *Micrococceæ*, très voisins des *Staphylococceæ* par certains caractères, se rencontrent souvent en association.

La *morphologie* des staphylocoques est bien connue : En cultures, sur milieu liquide, l'aspect répond à l'image classique de la grappe de raisin; mais, dans les produits pathologiques, le groupement différent des *cocci* rend quelquefois l'identification plus difficile.

De toute façon, le caractère de base reste *la coloration de Gram*, puisque le staphylocoque est un des germes les plus difficiles à décolorer par l'alcool. L'étude de mise en évidence d'organites nucléaires, les recherches concernant la texture du *coccus* staphylococcique au microscope électronique n'ont pas donné de résultats comparables à ceux obtenus pour les germes Gram négatifs.

Cependant, des variations importantes du milieu extérieur et des conditions de vie peuvent rendre plus fragile ce caractère de Gram-positivité, au point que l'on ait décrit des staphylocoques Gram-négatifs dans les vieilles cultures et à l'intérieur des leucocytes du pus.

La mise en culture du staphylocoque est aisée, puisque tous les milieux de culture simples lui conviennent. Mais l'étude sur milieux inorganiques a montré l'importance de certains facteurs de croissance indispensables, parmi lesquels de nombreuses vitamines.

Sur gélose, les colonies arrondies, brillantes, humides sont faciles à reconnaître, en général, qu'elles soient pigmentées ou non.

En bouillon, le trouble persistant et le dépôt tardif n'ont rien de caractéristique.

Le pigment produit apparaît mieux sur certains milieux de culture comme la pomme de terre, ce qui a fait distinguer trois sortes de germes aux premiers bactériologistes : staphylocoques doré, citrin et blanc.

En gélatine, le staphylocoque produit une liquéfaction progressive en entonnoir, à la température du laboratoire, ou mieux à 22°, vers le troisième jour, quelquefois plus tardivement. Au sixième jour, l'aspect du sac tronconique, avec dépôt pigmenté ou non, recouvert de liquide trouble, est typique.

Les réactions biochimiques du germe sur les divers milieux

varient beaucoup avec les souches. Mais, certains caractères sont fixes : *coagulation du lait; non production d'indol* en eau peptonée; *non dégradation* de l'*esculine, inuline, salicine,* alors que les glucides les plus courament employés au laboratoire sont *attaqués sans production de gaz : glucose, lévulose, maltose, lactose, saccharose, mannitol* et *amidon.*

Pendant longtemps, une grande confusion a régné dans la recherche des propriétés du germe, fonctions elles-mêmes de la souche considérée. On distinguait les ferments trypsiques liquéfiant la gélatine, dissolvant les hématies et les leucocytes, et une toxine retrouvée dans les filtrats de culture, surtout remarquable par son action dermonécrotique locale, après injection sous-cutanée.

L'expérimentation sur l'animal très sensible qu'est le lapin a permis depuis longtemps d'étudier l'action des staphylocoques suivant les doses injectées, la voie d'inoculation.

Il faut remarquer surtout le double aspect de la lésion staphylococcique : *suppuration* ou *nécrose,* qui se retrouve aussi dans la pathologie humaine si variée, dont ce germe est responsable.

L'homme sain peut héberger sur sa peau, ses muqueuses, un grand nombre de staphylocoques d'origine diverse. Que la résistance de l'hôte fléchisse, il semble que dans cette flore, si bénigne en apparence, se découvrent des qualités de virulence, jusque là inapparentes et l'on assiste à l'éclosion de cette pathologie si complexe, qui fait retrouver le staphylocoque dans des lésions aussi différentes que des furoncles, anthrax, suppurations de toute sorte, septicémies et septicopyohémies avec métastases plus ou moins graves.

De cette étude très brève des caractères généraux des staphylocoques, il y a lieu de retenir plusieurs faits :

1° La banalité de ces germes ne doit pas faire oublier qu'ils sont dangereux.

2° Ce sont des germes pathogènes qui, vivaces et très résistants, peuvent proliférer sur les milieux les plus simples et

possèdent une gamme importante d'enzymes leur permettant de tirer partie de tout ce qui les entoure.

3° Enfin, ils n'entraînent pas d'immunité. Les ré-infections sont toujours à redouter et, malgré l'avènement des antibiotiques dans la thérapeutique, l'étude des staphylocoques reste toujours d'actualité.

Données Modernes

Au cours de ces quinze dernières années, l'étude des staphylocoques pathogènes a pris une ampleur toute particulière. En effet, à la suite des travaux anglo-saxons, en général, et de CHAPMAN en particulier, leur recherche systématique a été menée sur une grande échelle.

Dans les pays de langue anglaise, le nombre des publications consacrées aux staphylocoques pathogènes est très important. En France, alors que les laboratoires de recherches s'intéressent beaucoup à ce germe (KOURILSKY et MERCIER), on ne retrouve pas la répercussion de ces travaux dans les laboratoires cliniques.

Il faut, en effet, distinguer les recherches faites dans les laboratoires hautement spécialisés, qui poussent l'identification des caractères biochimiques et sérologiques du germe aussi loin que possible par des recherches de mise en œuvre délicate, des recherches faites à partir de ces travaux dans le but de trouver des épreuves simples et courantes pour les laboratoires cliniques.

Ces techniques simplifiées, si elles varient dans les détails d'un pays à l'autre, sont suffisamment rigoureuses et l'accord s'est fait pour définir les caractères pathogènes des staphylocoques à la lumière des résultats cliniques et biologiques.

Nous envisagerons l'exposé des données modernes des staphylocoques en trois Chapitres.

CARACTÈRES BIOLOGIQUES.

TENTATIVES DE CLASSIFICATION.

ACTION DES ANTIBIOTIQUES.

CHAPITRE PREMIER

CARACTÈRES BIOLOGIQUES

Sous le titre de « *Caractères biologiques* », nous désignons l'étude des *caractères bactériologiques* modernes des staphylocoques pathogènes et, d'autre part, l'étude des *caractères sérologiques* de ces mêmes germes.

I. CARACTÈRES BACTÉRIOLOGIQUES

D'une manière générale et sans faire d'hypothèse quant à leur unicité, la recherche de ces caractères, au laboratoire, vise, sinon à mesurer, du moins à reproduire l'action de la « *Toxine staphylococcique* » sur les tissus de l'organisme et, principalement, les éléments du sang.

Pour désigner les effets produits dans l'organisme par les cultures ou les filtrats staphylococciques, les différents auteurs ont créé des termes très variés : « toxine staphylococcique », « coagulase », « fibrinolysine »...

Cette variété d'effets soulève la question de savoir si quelques-uns d'entre eux sont dus à une seule et même toxine staphylococcique, dont l'action varie avec les cellules parmi lesquelles elle entre en contact, ou si chaque effet toxique est dû à un facteur toxique séparé (Blair) [5].

Nous bornerons notre étude aux principaux caractères des poisons staphylococciques :

— coagulase,
— hémolysines,
— fibrinolysine,
— entérotoxine,

dont nous discuterons au cours de cet exposé l'unicité ou la pluralité.

Pour chacun de ces caractères, nous rappelerons, après un bref historique, quelques généralités, les techniques de mise en évidence, les propriétés physiques, chimiques et biologiques.

A côté des caractères précédents, il en est d'autres basés sur des propriétés biochimiques des staphylocoques pathogènes :

— fermentation du mannitol,
— épreuve au violet cristallisé,
— liquéfaction de la gélatine,
— pouvoir de cultiver en milieu hypersalé.

Ces caractères servent de base aux milieux usuels d'étude des staphylocoques pathogènes au laboratoire. L'énumération des formules de ces milieux terminera ce chapitre consacré aux caractères bactériologiques modernes des staphylocoques pathogènes.

— —

COAGULASE

C'est le Français Delezenne [33] qui, en 1898, signala le premier l'action coagulante du staphylocoque doré sur le plasma oxalaté.

En 1903, Loeb confirma cette découverte et Much, en 1908, établit une relation entre la coagulase et le pouvoir pathogène des staphylocoques.

La nature de la coagulase staphylococcique, ou « staphylocoagulase », ne fut vraiment étudiée qu'en 1919 par Gratia [52], [53], [54], [55].

Les *staphylocoques* sont les seuls à posséder cette propriété parmi les *cocci* pathogènes. A part quelques souches de *Pseudomonas æruginosa, Serrata marcesens, Escherichia coli* et *Bacillus subtilis,* aucun autre germe n'a donné de réaction positive (Blair) [5] , (Harper et Conway) [59].

Le mode de coagulation est différent entre ces espèces :

— *Les Gram-négatifs* agissent sur le plasma citraté en provoquant la rupture du citrate; la libération conséquente des ions Ca^{++} déclenche le mécanisme normal de coagulation du plasma. Mais ces micro-organismes ne peuvent plus coaguler le plasma lorsque le citrate est en excès ou le calcium lié à un anion non métabolisable (oxalate). De même, une dilu-

tion élevée du plasma empêche ce phénomène, puisque la rupture du citrate et la libération conséquente des ions Ca++ reste sans action dans un plasma dont les éléments de coagulation son trop dilués pour agir.

— *Les staphylocoques* agissent par action diastasique, comme nous le verrons ultérieurement.

Parmi les staphylocoques eux-mêmes, on note une différence dans cette propriété. Les souches dorées coagulent le plasma plus vite que les autres (Blair) [5].

Cette propriété est stable, peut-être plus que la pigmentation et la production d'hémolysines.

A. MISE EN ÉVIDENCE

Les techniques de mise en évidence de la coagulase peuvent s'effectuer de deux façons :

1° soit en milieu liquide,

2° soit en milieu solide.

1° En milieu liquide.

Les techniques de recherche de la coagulase en milieu liquide consistent à mettre, dans un tube à hémolyse, la souche à étudier et une certaine quantité de plasma, dans le but, après incubation à 37° pendant 24 heures, d'obtenir la coagulation de ce plasma.

a) **L'ensemencement** du plasma, avec la souche à étudier, peut se faire de deux manières :

— *Soit directement,* en émulsionnant à l'anse de platine une culture de vingt-quatre heures sur milieu solide (Chapman) [13], (Christie et Keogh) [29], (Cruickshank) [32], (Penfold) [81].

— *Soit,* en ajoutant un volume variable d'une culture de vingt-quatre heures en bouillon. Le volume sera mesuré en comptant les gouttes ou à la pipette (Evans) [40], (Gillespie) [50],

Il y a lieu, dans ce dernier cas, de faire un témoin plasma-bouillon stérile, pour avoir la certitude que le bouillon ne coagule pas spontanément le plasma.

b) **L'incubation** des tubes à hémolyse se fait soit au bain-marie, soit à l'étuve à 37°, pendant vingt-quatre heures.

Il est recommandé, dans les premières heures, de faire des *lectures fréquentes* pour surprendre l'apparition du caillot. En effet, il arrive quelquefois, après la coagulation, que le caillot soit détruit par la fibrinolysine. Une coagulase positive risque donc de passer inaperçue, si l'on néglige cette surveillance.

Une coagulase sera considérée comme positive pour tout début de coagulation. Le volume du coagulum et la vitesse de coagulation n'ont pas de rapport avec la virulence du germe (Chapman) [13].

Au bout de 24 heures, les tubes où aucune coagulation n'est apparue sont considérés comme négatifs.

A côté de ces techniques, qui nécessitent une culture de vingt-quatre heures du germe à éprouver, Lominsky et Grossfeld [71] ont proposé un test rapide pour l'identification d'un staphylocoque pathogène, avant tout début de pénicillinothérapie. Puisque les staphylocoques pathogènes sont à peu près les seuls germes à coaguler le plasma (Blair) [5], (Harper et Conway) [59], il suffirait d'observer le résultat de l'émulsion directe du produit pathologique, retiré de l'organisme, et du plasma. La surveillance s'échelonne de vingt minutes à plusieurs heures. Mais la comparaison avec un témoin s'avère impossible dans cette méthode.

c) **Les critiques,** faites aux méthodes de recherche de la coagulase en milieu liquide, tiennent à la multiplicité des facteurs :

— *L'origine du plasma :* En présence de plasma de lapin, la coagulation est plus rapide qu'avec le plasma humain. Pour certains auteurs, les résultats seraient parallèles.

Chapman [17] a montré que le sang total humain est coagulé plus vite que le plasma correspondant.

Voici classés, d'après Cruickshank [32], les différents

plasma selon leur valeur coagulante décroissante : *homme* et *lapin, cheval* et *cobaye, bœuf* et *mouton.*

Le plasma est obtenu après ponction veineuse, chez l'homme; après ponction intracardiaque, chez les petits animaux.

— *Les anticoagulants :* Les anticoagulants les plus employés sont le *citrate de sodium* et l'*oxalate de potassium.*

Le citrate de sodium s'emploie à la concentration de 4 %. Harper et Conway [59] recommandent de lui ajouter de l'héparine.

L'oxalate de potassium agit à la concentration de 2 ‰ (Richou) [87].

Le « Liquoïde » est abandonné en raison de son action inhibitrice sur le phénomène. La présence de glucose doit être évitée pour la même raison (Knott) [66].

— *Le vieillissement du plasma :* Le plasma frais doit être conservé en glacière, mais il perd très vite la faculté d'être coagulé : un mois après son prélèvement, cette propriété est nulle.

C'est pourquoi Chapman a proposé d'utiliser le plasma desséché. Pour Colbeck et Proom [30], le plasma de lapin serait stable pendant douze mois sous cette forme. Au moment de l'emploi, il suffit de l'additionner d'un volume d'eau stérile pour le ramener à son volume initial.

Le seul inconvénient à son emploi serait sa vitesse de coagulation plus lente.

— *La dilution du plasma :* Desséché ou non, le plasma peut être employé pur ou dilué.

Des études comparatives ont montré l'influence de la dilution du plasma sur la vitesse de coagulation. Les taux suivants de dilution, classés par Richou [87], donnent des réactions de moins en moins sensibles :

1/3, 1/5, pur, 1/10, 1/20.

— *Le liquide de dilution :* L'eau physiologique, par les ions qu'elle apporte, favorise la coagulation beaucoup mieux que l'eau distillée (Cruickshank) [32], (Richou) [87].

— *Le volume du plasma* et *le volume de l'ensemencement* interviennent aussi dans le phénomène.

Nous avons résumé sous forme de tableau les techniques employées par différents auteurs (Tableau I) :

		Chapman 1934	Cruickshank 1937	Gillepsie 1939	Christie et Keogh 1940	Penfold 1944	Kourilsky et Mercier 1945	Colbeck et Proom 1948	Miale et Frye 1948	Evans 1948
PLASMA	Origine	humain	humain	humain		humain	humain	lapin (sec)	humain	Difco (sec)
	Anti — Coagulant	citrate	citrate à 4%	citrate ou oxalate à 2‰	citrate					
	Dilution du plasma en eau physiologique	1/5	1/10	1/10		1/3	pur			
	Volume de plasma	0,5 cm³	1,0 cm³	0,5 cm³	0,5 cm³	1,0 cm³	0,3 cm³	0,5 cm³	0,5 cm³	0,5 cm³
REACTION	Quantité de culture	une anse chargée	une anse chargée	V gouttes	une anse chargée	une anse chargée	0,2 cm³	IV gouttes	0,5 cm³	II gouttes

Dans le but de réduire ces causes d'erreur, certains bactériologistes ont proposé la recherche de la coagulase en milieu solide.

2° En milieu solide.

Penfold [81] donne la technique suivante :

Le milieu se compose d'une gélose à 2,5 %, contenant 25 % de plasma humain. Le mélange est coulé en boîte de Petri en couche aussi mince que possible. Il est recommandé de le préparer la veille du test et de le conserver en glacière. Plusieurs souches peuvent être repiquées par boîte. L'incubation se fait à l'étuve à 37° pendant 24 heures. Les résultats sont lus de la façon suivante :

Une opacité autour d'une colonie (« peri-colony opacity ») peut apparaître après huit heures d'incubation, sous forme d'une zone circulaire et concentrique. Elle devient plus marquée après vingt-quatre heures et de 3 mm. de diamètre passe à 8 mm., en moyenne.

96 % des souches coagulase-positives, testées en milieu liquide, la donnent.

Une opacité très légère (« sub-colony opacity ») ou une absence d'opacité définit des souches coagulase-négatives.

Colbeck et Proom [30] ont proposé d'employer le plasma desséché de lapin qui, d'après eux, donnerait les mêmes résultats que le plasma frais en évitant des manipulations.

Dernièrement, en 1948, Miale et Frye, reprenant les techniques jusque là employées, ont proposé un test standard pour mesurer l'activité de la coagulase staphylococcique.

Puisque les concentrations d'agents réactifs sont d'une grande importance, il paraîtrait intéressant de faire des dilutions en série d'une culture standard en bouillon et de les mettre en présence d'un volume donné de plasma, de dilution donnée.

Les cultures sont de 12 heures en bouillon. Ces auteurs conseillent l'addition d'une petite quantité d'acide para-amino benzoïque.

On dispose de cinq tubes contenant les dilutions de la culture au 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160. Dans tous les tubes, on ajoute

aseptiquement 0,5 cm^3 de plasma frais, oxalaté à 2 ‰ et dilué au 1/10 en eau physiologique. On porte au bain-marie à 37°. Les lectures sont faites toutes les heures, pendant six heures.

Cette méthode augmente les chances de rencontrer une coagulase positive, alors qu'en se fiant à une technique plus limitée, elle risque de passer inaperçue.

Enfin, une *méthode indirecte* pour détecter les souches de staphylocoques coagulase-positives a été proposée par Birch-Hirschfeld : Le plasma qui est coagulé par un staphylocoque particulier « agglutinera » les staphylocoques quand ils seront émulsionnés ensemble sur une lame.

La méthode de Cadness-Graves [12], basée sur ce principe, est la suivante : « Mettre côte à côte une lame propre et une lame dégraissée, y déposer une goutte d'eau avec une anse de 2 mm. Emulsionner la colonie à éprouver dans la première goutte, avec un minimum d'étalement; lorsque la suspension est homogène, porter l'anse humide dans l'autre goutte (sur la lame dégraissée) et l'étaler en une pellicule comme pour une coloration. La quantité de culture devra être assez grande, ou le volume d'eau assez petit pour donner dans la première goutte une émulsion aqueuse équivalente en opacité à 100.10^9 *Bact. coli* par cm^3, au moins. Mélanger une très petite anse de plasma humain frais dans la première goutte, par mouvements circulaires, 3-5 par seconde, pendant 10 secondes. Si l'agglutination se produit, un diagnostic présomptif de *Staph. pyogenes* peut être posé, confirmé par l'apparence du frottis coloré sur la lame dégraissée. »

B. PRODUCTION DE COAGULASE

La coagulase est obtenue au maximum par le procédé classique de culture du germe en milieu de Burnet, sous atmosphère de CO^2.

Nous aurons l'occasion de parler plus longuement des conditions de production des toxines staphylococciques en étudiant les hémolysines et l'entérotoxine.

C. PROPRIÉTÉS

1° Physiques.

a) **Précipitabilité :** Le principe actif de la coagulase peut être précipité, mais souvent avec destruction partielle, à partir d'un filtrat de culture, par l'alcool, l'acide acétique, le sulfate d'ammonium à demi-saturation.

Ce principe actif, précipité par l'alcool, est dialysable à travers la cellophane, mais non à travers le collodion.

Le précipité, après plusieurs centrifugations suivies de lavages, peut être desséché. Le produit ainsi obtenu se redissout rapidement dans l'eau (Walker, Schaffer, Derow) [97].

b) **Filtrabilité :** La présence d'une substance coagulante dans les filtrats de culture de staphylocoques a été démentie, au début, par Kleinschmidt. Au contraire, Cruickshank [32], Gerheim, Ferguson, Travis [48], Walker, Schaffer, Derow [97], Richou [87], Pillet [82], pensent qu'elle est filtrable, tout au moins en partie. D'ailleurs, tous les filtrats ne sont pas actifs, puisque la coagulation peut être obtenue avec des cultures en bouillon ou en gélose ne produisant aucun filtrats actifs (Blair) [5].

Il semble que la coagulase puisse être adsorbée dans certains filtres : Berkefeld « V » et « N ».

c) **Résistance à la chaleur :** Le caractère physique majeur de la staphylocoagulase est sa thermostabilité (Gengou) [46], (Walker, Schaffer, Derow) [97], (Richou) [87], (Pillet) [82].

Une température de 100° pendant 30 minutes n'entraîne qu'une destruction partielle de ce corps. Mais sa thermostabilité varie avec les souches (Fisher).

2° Biochimiques.

a) **Action des diastases protéolytiques :** La staphylocoagu-

lase est inactivée par la trypsine, la pepsine et la papaïne (Walker, Schaffer, Derow) [96].

b) **Action des antiseptiques :** Certains antiseptiques n'inhibent pas la staphylocoagulase : l'hydroquinone, une tension basse en oxygène, le phénol à 0,15 %, le permanganate et la trypaflavine à 0,1 % (Gengou) [46].

Mais l'on observe une inactivation complète par le formol à 0,3 %, à 37°, pendant quarante-huit heures (Gengou) [46].

Farkas, en 1947, a montré que le brome à 0,3 % et l'iode à 0,8 % étaient aussi inhibiteurs.

c) **Action des antibiotiques :** D'une manière générale, presque toutes les sulfamides étudiées accélèrent la coagulation du plasma, en présence d'acide para-amino-benzoïque qui agit dans le même sens (Walker, Schaffer, Derow) [97] : le sulfathiazol (à la concentration de 1 à 10 mg./cm^3) et la para-amino-phényl-sulfamide ont le même effet.

Inversement, la sulfapyridine et la sulfadiazine ont un effet inhibiteur sur la coagulation du plasma.

De plus, Lominsky et Roberts ont trouvé dans le sérum normal, 212 fois sur 348, une substance qui neutralisait la coagulase. Cette substance inhibitrice est précipitée avec la sérum-globuline par le sulfate d'ammonium et résiste à 63° pendant trente minutes.

La pénicilline ne commence à inhiber la coagulase qu'à une concentration de 49 unités/cm^3 et son effet est total à une concentration de 25.000 unités/cm^3 (15 mg.). Donc sans action aux taux normaux, ainsi que la tyrothricine, la gramicidine et la tyrocidine.

La streptomycine inhibe la coagulase à un taux antibiotique de 0,25 mg/cm^3.

3° Biologiques.

a) **Pouvoir antigénique :** La question du caractère antigénique de la staphylocoagulase est fortement discutée. On ne retrouve pas dans le plasma des sujets porteurs d'infection

staphylococcique, un facteur capable de neutraliser cette coagulase (Cruickshank) [32].

Des essais d'immunisation avec des filtrats de culture de staphylocoques coagulase-positifs n'ont pas provoqué la formation d'anticorps (Richou) [87], (Mercier, Pillet, Pery) [77].

b) **Constitution biochimique** : La staphylocoagulase est apparemment une substance enzymatique, agissant sur le plasma de différents animaux et de l'homme à la manière de la thrombine (Cruickshank) [32].

Pour Gratia [55], la coagulase ne fait cependant pas partie du groupe de la thrombine, ni de ses précurseurs, quoiqu'elle ressemble à la thrombine en produisant de la fibrine à partir d'une solution pure de fibrinogène.

Il semble qu'elle ait besoin pour agir d'un co-ferment présent dans le plasma (Smith et Hale).

Gerheim, Ferguson et Travis [48] proposent le terme de « prostaphylocoagulase » pour le produit staphylococcique et celui de « coagulase » comme le résultat de la combinaison du produit staphylococcique avec le co-facteur (« activateur ») plasmatique.

Le co-facteur plasmatique ou « activateur » serait associé aux albumines du plasma (Gerheim, Ferguson, Travis) [47] et globulines du plasma (Tager).

En résumé, si l'on se rapporte aux travaux de Walker, Derow et Schaffer [96], la question de savoir si la staphylocoagulase est ou non un enzyme demande encore quelques précisions :

– Son extrême résistance à l'inactivation par la chaleur apporte quelques doutes sur sa nature typiquement enzymatique;

La destruction complète de l'activité de la coagulase par la trypsine ou la pepsine indique qu'elle contient des liaisons hydrolysables par ces enzymes. Si cette activité dépend de l'intégrité de sa structure protéinique, elle est remarquablement stable à la chaleur.

HÉMOLYSINES

L'action lytique des filtrats de cultures staphylococciques sur les globules rouges est connue depuis longtemps (Neisser et Wechsberg) (Besredka).

La substance capable de produire de tels effets a reçu des noms divers : « toxine », « lysine », « hémotoxine », « hémolysine ». C'est ce dernier, aujourd'hui, qui lui reste et que nous emploierons seul.

Cependant, les auteurs ne tardèrent pas à remarquer que certaines cultures avaient une action différente sur les hématies *in vitro* et chez l'animal vivant (Bigger, Boland et O'Meara) [4].

Les souches hémolytiques ont été classées en trois types : α, β et $\alpha\beta$ (Glenny et Stevens) [51], Bryce et Rountree) [8].

Les staphylocoques ne sont pas les seuls germes à posséder cette propriété. Parmi les *cocci* pathogènes, les streptocoques ont la même action.

Tous les staphylocoques ne produisent pas d'hémolysine; le type hémolytique des staphylocoques, aussi, est en rapport avec leur origine, humaine ou animale.

Sur ces différences repose tout l'intérêt de l'étude des hémolysines.

A. PRODUCTION D'HÉMOLYSINE

1° Techniques générales.

L'hémolysine peut être recueillie :

— Soit dans le milieu de culture, où elle se répand en dehors des corps microbiens;

— Soit à partir des corps microbiens eux-mêmes.

a) **Dans le milieu :** Le milieu destiné à la production d'hémolysine est celui de Burnet [9], qui développe au maximum les caractères toxiques des staphylocoques : infusion de viande gélosée. La culture se fait en présence d'un mélange

variable d'oxygène et de gaz carbonique (10 % : Parker, Hopkins, Gunther; 20 % : Woolpert et Dack), dans un appareil tournant (Ramon, Boivin, Richou) [85].

L'incubation a lieu à 37° pendant six jours. Le taux d'hémolysine augmente jusqu'au deuxième jour, puis se stabilise (Favorite et Hammon) [41].

Gladstone a obtenu des taux d'hémolysine satisfaisants dans un milieu composé d'acides aminés, de sels inorganiques et de facteurs vitaminiques (B1 et acide nicotinique Knight, 1937). Il a aussi trouvé que les hydrolysats de protéines sont supérieurs aux mélanges de leurs amino-acides constituants.

Il a obtenu les meilleurs résultats avec des taux d'oxygène et de gaz carbonique égaux ou des mélanges de 75 % d'O2 et de 25 % de CO2.

Quel que soit le milieu, l'hémolysine est recueillie après centrifugation : c'est le liquide surnageant.

b) **A partir des corps microbiens :** Cette technique a été décrite pour la première fois par Bigger, Boland et O'Meara, en 1927 [4].

Elle consiste à faire une suspension en eau physiologique des corps microbiens à partir d'une culture en milieu solide. La suspension est centrifugée pour précipiter les *cocci* et le liquide surnageant obtenu a été trouvé très lytique sur les hématies.

D'une manière générale, la production d'hémolysines a lieu dans les mêmes conditions que l'entérotoxine (Dolman) [34].

Qu'une souche de staphylocoques donne une hémolysine dans un milieu spécial ou à partir d'une émulsion de culture, il reste à mettre en évidence cette propriété sur les hématies.

2° Mise en évidence.

Les techniques de mise en évidence sont sensiblement les mêmes pour les hémolysines α, β et $\alpha\beta$. Seules varient les hématies sensibles et les conditions de culture.

Il y a lieu de distinguer, comme pour la coagulase, deux sortes de techniques :

Des méthodes quantitatives, en milieu liquide;
— *Des méthodes qualitatives*, en milieu solide.
Nous donnerons les techniques propres à chaque hémolysine dans l'étude particulière de celle-ci.

a) **Mise en évidence en milieu liquide :**

Elle consiste à faire des dilutions croissantes de l'hémolysine que l'on teste en présence d'hématies sensibles (Bigger, Boland et O'Meara) [4].

On utilise couramment des tubes à hémolyse ordinaires. Le premier contient 1,0 cm^3 d'hémolysine, le second 0,5 cm^3, le troisième 0,25 cm^3... On complète à 1,0 cm^3 avec du sérum physiologique et chaque tube reçoit 1,0 cm^3 d'une suspension d'hématies lavées trois fois. On agite. Le volume, dans chaque tube, est de 2,0 cm^3. L'incubation se fait au bain-marie à 37°, pendant une heure, une heure et demie, vingt heures, selon le type d'hémolysine recherché.

Le taux limite est celui du dernier tube où l'hémolyse apparaît.

b) **Mise en évidence en milieu solide :**

Cette technique qualitative a été décrite par Bigger, Boland et O'Meara [4].

Elle consiste à mélanger, à une gélose nutritive à 2 %, quelques centimètres cubes de sang citraté ou oxalaté. Ce milieu est coulé en boîtes de Petri, de telle sorte que l'épaisseur n'excède pas 3 à 4 mm. Les souches sont repiquées sur cette gélose. Les boîtes sont mises à l'étuve à 37°, pendant un temps variable selon le type d'hémolysine recherché.

La lecture est facile : Il suffit d'observer les colonies et le milieu autour d'elles.

Les souches hémolytiques sont entourées d'un hâlo décoloré, qui tranche sur le reste du milieu. Les souches non hémolytiques ne donnent rien de semblable et apparaissent peu sur la gélose au sang.

B. ÉTUDE DES HÉMOLYSINES

1° Hémolysine α :

L'hémolysine α est exclusivement produite par les souches de staphylocoques d'origine humaine.

Elle est active, par ordre décroissant, sur les hématies de lapin, d'homme et de mouton (Glenny et Stevens) [51], (Bryce et Rountree) [8], (Lefèvre de Harric) [70].

a) **Pour sa mise en évidence,** le sang de lapin pourra donc être utilisé, aussi bien en milieu liquide qu'en milieu solide.

Par la méthode quantitative en milieu liquide, Dolman et Kitching ont défini, en 1935, la dose hémolytique minimum d'hémolysine (« minimum hæmolytic dose = M.H.D.) comme: « Le volume de toxine suffisant à hémolyser complètement un centimètre cube d'une suspension d'hématies de lapin à 1 % en eau physiologique normale, après une heure d'incubation à 37°. »

Donc, *la recherche de l'hémolysine par la méthode quantitative sera faite en présence d'hématies de lapin, après une heure d'incubation à 37°.* Seuls seront tenus comme hémolytiques, les staphylocoques qui réalisent une hémolyse égale ou supérieure à 1 M.H.D.

Pour la recherche qualitative, le milieu solide employé sera une gélose au sang de lapin, incubée pendant vingt-quatre heures. Les souches hémolytiques donnent une auréole transparente très visible, à bords externes flous.

Sur gélose au sang de mouton, l'aspect est identique.

b) **Propriétés :** *Son caractère physique* principal est d'être détruite à 56°.

Elle précipite par l'acide acétique (Burnet et Freeman) [10], l'acide trichloracétique (Boivin et Izar) [6], le sulfate d'ammonium à 65 % (Hammon) [58].

Elle est difficilement filtrable, sauf sur Berkefeld « N ».

Au point de vue chimique, elle serait de nature protéique.

A l'inverse de la coagulase, elle est antigénique.

Elle est sensible à l'action de la lumière, des oxydants; le bleu de méthylène l'inactive sans perte de son pouvoir antigénique.

Les acides minéraux la détruisent; l'action des acides organiques est variable. Le glycérol inhibe son action, ainsi que les solutions hypertoniques de chlorure de sodium et certains autres sels de sodium, potassium et magnésium.

La lécithine, sur plaque de gélose, enraye le phénomène d'hémolyse, alors que le cholestérol a une action antagoniste. L'action hémolytique de l'hémolysine α est considérablement réduite par l'huile d'olive.

Certains auteurs lui attribuent une action dermonécrotique chez le cobaye et une action léthale chez la souris, par voie intraveineuse ou intrapéritonéale (Burnet) [9], (Glenny et Stevens) [51], (Pillet) [82], faisant de la toxine léthale, la toxine dermonécrotique et de l'hémolysine α une seule et même substance.

L'unicité de ces toxines serait basée sur la ressemblance de leurs propriétés physiques, sur le fait que toutes les trois seraient retrouvées dans les filtrats étudiés et qu'elles seraient neutralisées quantitativement par un seul anti-sérum.

Gengou [44] [45], soutenant une opinion inverse, pense que l'absence de l'une d'elles dans un filtrat donné était la meilleure preuve de leur manque d'identité.

De même, on a voulu faire de la coagulase et de l'hémolysine α une même substance. Or, si l'on recherche une hémolysine α par la méthode des dilutions en série avec une toxine contenant à la fois hémolysine α et coagulase, l'hémolyse se produit et le liquide restant a toujours une action coagulante vis-à-vis du plasma.

Enfin, la coagulase est thermostabile, l'hémolysine α ne l'est pas (Cruickshank) [32]. Il faut donc séparer ces deux propriétés.

2° Hémolysine β :

L'hémolysine β ne proviendrait que des souches d'origine animale.

Son action s'exerce sur les hématies de mouton (Bigger,

Boland et O'Meara) [4] et sur les hématies humaines (Bryce et Rountree) [8]. Elle n'a pas d'action sur les hématies de lapin (Glenny et Stevens) [51], (Bryce et Rountree) [8].

Donc, les hématies de mouton donneront les meilleurs résultats dans les milieux destinés à mettre en évidence l'hémolysine β. On définit une dose hémolytique minimum pour l'hémolysine β comme pour l'hémolysine α.

Les milieux employés sont identiques, mais dans le cas de la recherche de l'hémolysine β, les tubes ou les boîtes devront être incubés à 37°, pendant une heure, puis portés dans un bain glacé ou dans un réfrigérateur, pendant une heure.

Le taux de production d'hémolysine β augmente considérablement par ce traitement. C'est l'épreuve de « hot cold lysis », décrite pour la première fois par Bigger, Boland et O'Meara [4], en 1927, et confirmée depuis par de nombreux auteurs.

Sur gélose au sang de mouton, la zone d'hémolyse β apparaît circulaire, très transparente, à limites extérieures très nettes, comme *tracées au compas* et qui *augmente après réfrigération.*

Dans les mêmes conditions, sur gélose au sang de mouton, se révèle un aspect différent de l'*hémolysine* α : zone d'hémolyse également circulaire, à limites extérieures *floues*, dont la surface n'est pas aussi transparente et claire que l'hémolyse β. Cette limite extérieure *n'est pas augmentée par réfrigération.*

a) **Propriétés :**

L'hémolysine β résiste 15 minutes à 60°. Par la chaleur à 100°, elle est détruite en 20 minutes. Insoluble dans l'alcool, l'éther, l'acétone, elle est soluble dans l'eau et le sérum physiologique (Bigger, Boland et O'Meara) [4]. Elle est précipitée à partir de ses solutions par le sulfate d'ammonium à 65 % (Hammon) [58].

Elle est toxique pour certains animaux de laboratoire, provoquant par voie sous-cutanée un érythème sans nécrose, à la dose de 0,1 cm³ d'hémolysine β ayant un titre hémolytique de 1/5.000 pour les hématies de mouton. Elle provoque la mort du lapin par voie intraveineuse aux doses de 0,5 à 2 cm³

d'hémolysine β ayant un titre hémolytique de 1/7.000 (Bryce et Rountree) [8].

Elle est antigénique et peut être transformée en anatoxine par le formol.

Au point de vue antigénique, il n'y a aucune relation entre les hémolysines α et β. Les antitoxines correspondantes n'ayant aucune action croisée (Bryce et Rountree) [8].

3° Hémolysine $\alpha\beta$.

Certaines souches de staphylocoques d'origine humaine et animale produisent un mélange d'hémolysines α et β (Glenny et Stevens) [51], (Bryce et Rountree) [8]. Elles sont en petit nombre chez l'homme.

Leur mise en évidence s'effectue sur une plaque de gélose au sang de mouton, dans les mêmes conditions de formation que l'hémolysine β. Après passage en glacière, on observe une zone d'hémolyse centrée sur la colonie, dans laquelle se dessinent plusieurs zones d'hémolyse en anneaux concentriques alternativement clairs et flous.

Il s'agirait d'un mélange d'hémolysines. En effet, à partir d'une hémolysine $\alpha\beta$, obtenue en milieu de Burnet, par exemple, on peut détruire l'un des composants par divers procédés et identifier l'hémolysine restante sur plaque de gélose au sang.

L'inactivation de l'hémolysine α peut se faire par :

— neutralisation avec l'antitoxine α;

— formolisation différentielle (Surgala) [91].

L'inactivation de l'hémolysine β peut se faire par neutralisation avec l'antitoxine β (Bigger, Boland et O'Meara) [4], (Glenny et Stevens) [51], (Bryce et Rountree) [8].

FIBRINOLYSINE

Etudiée chez les streptocoques hémolytiques (Tillet et Garner) [93], la propriété de liquéfier la fibrine a été retrouvée chez certaines souches de staphylocoques. Toutefois, chez ces derniers, le phénomène est plus lent.

Cette propriété s'observe parfois lors d'une épreuve de coagulase, qu'elle peut négativer comme nous l'avons vu : On assiste

à la liquéfaction plus ou moins tardive du caillot. Ceci a été mis en évidence par Much, en 1908.

La liquéfaction lente du plasma coagulé a été décrite par Fisher chez certains autres germes : *Bacillus subtilis, Proteus vulgaris, Pseudomonas æruginosa, Alcaligenes fecalis* et les *diphtérimorphes*. Tillet [93] pense que ceci serait plutôt le résultat de leurs propriétés protéolytiques.

La fibrinolysine serait un caractère presque exclusif des staphylocoques pathogènes d'origine humaine (Madison) [74].

1° Les techniques de mise en évidence sont quantitatives et qualitatives.

a) **Quantitatives** (Tillet et Garner, 1933) [93] :

Pour préparer la fibrine, on provoque la coagulation d'un plasma oxalaté par recalcification, ou on additionne de thrombine une solution de fibrinogène purifiée.

Sur le caillot ainsi obtenu, on fait agir le filtrat ou le centrifugat de la culture à tester en dilutions croissantes.

Le premier tube de la rangée qui présente une liquéfaction du caillot donne le titre de l'activité de la fibrinolysine.

b) **Qualitative** (Christie et Wilson) :

La fibrine est obtenue en soumettant du plasma de lapin oxalaté à la température de 56° pendant 10 minutes. Après centrifugation et remplacement du liquide surnageant par un égal volume d'eau physiologique, on obtient une suspension de fibrine, dont un centimètre cube est ajouté à 6 cm^3 de gélose nutritive à 3 %, préalablement fondue et ramenée à 56°. Ce mélange est alors coulé en boîte.

Les souches à étudier sont ensemencées et la lecture se fait après 12 heures d'étuve.

Dans le cas d'une souche fibrinolytique, la colonie s'entoure d'une auréole transparente, tranchant sur le milieu opaque.

2° Propriétés.

La fibrinolysine purifiée a pu être obtenue quelquefois à

partir de filtrats de cultures, par précipitation avec l'alcool ou l'acide trichloracétique (Pillet, Mercier, Pery) [83].

Les avis sont partagés en ce qui concerne sa résistance à la chaleur. Gengou [46] considère la fibrinolysine comme très stable; Pillet, Mercier, Pery, par contre, ont montré que cette substance, chauffée trente minutes à 100°, perdait 100 % de son activité.

Au point de vue chimique, il paraît s'agir d'une protéine (Pillet) [82].

La fibrinolysine semble douée de propriétés antigéniques (Pillet, Mercier, Pery) [83].

Certains auteurs, au lieu de séparer les deux propriétés, coagulase et fibrinolysine, les ont réunies comme n'étant que deux étapes successives dans la liquéfaction du plasma (Gengou) [46], (Van Breuseghem) [7]. Pour Pillet [82], la différence de leurs caractères antigéniques permettrait de dire qu'il n'en est pas ainsi.

Les souches de staphylocoques pathogènes d'origine animale ne produiraient pas de fibrinolysine. L'hypothèse selon laquelle elles neutraliseraient leur fibrinolysine par l'hémolysine β ne semble pas confirmée. Pour Pillet [82], il s'agirait plutôt d'un défaut de production de fibrinolysine par ces mêmes souches.

Les souches de staphylocoques pathogènes d'origine humaine possèdent avec une grande régularité le double caractère de coagulase et de fibrinolysine et l'on peut estimer que la recherche de l'une ou l'autre épreuve donne une idée nette du caractère pathogène de la souche étudiée.

ENTÉROTOXINE

Depuis quelques années, l'attention des bactériologistes a été attirée sur le rôle certain des staphylocoques dans des empoisonnements alimentaires, frappant de très nombreux individus à la fois et d'allure clinique totalement différente de ceux

causés par les germes considérés comme habituels dans ces syndromes (*Salmonellæ, Proteus,* B. botulinique).

Déjà, en 1894, Denys avait parlé du rôle des staphylocoques dans certaines intoxications alimentaires. En 1907, Calmette et Petit, à Lille, expérimentant sur des lapins, montrèrent que le staphylocoque peut franchir la barrière intestinale [49]. Mais c'est surtout dans les pays anglo-saxons, gros consommateurs de charcuterie et de conserves, que les recherches ont été multipliées.

Les aliments incriminés, dans les empoisonnements à staphylocoques, sont nombreux. En premier lieu, viennent ceux qui sont exposés aux manipulations de fabrication, puis ceux qui peuvent être souillés par une eau malpropre, ceux qui ont subi un défaut de cuisson, enfin les aliments qui peuvent être contaminés directement par les hommes ou les animaux malades.

Il est classique de citer : Les pâtisseries, le lait frais ou conservé, les crèmes glacées, les fromages, la charcuterie, la viande crûe, les conserves mal stérilisées, les salades, les huîtres et certains poissons salés (Blair) [5], (Gernez-Rieux, Buttiaux, M^lle^ Brogniart) [49]. Ils peuvent être souillés par l'homme, malade ou contagieux, par sa gorge, son rhino-pharynx (Chapman) [18] [26], ses mains, ses plaies, ses excrétas.

La vache atteinte de mastite, aiguë ou chronique, est dangereuse (Gwatkin, Hadwen et Le Gard) [56].

L'empoisonnement alimentaire par les staphylocoques est souvent massif. Dolman rapporte un cas de 600 individus atteints simultanément.

Le début est rapide, brutal. En général deux à trois heures après l'ingestion du produit contaminé, le sujet présente une salivation abondante, des nausées, des vomissements, une diarrhée profuse, de l'asthénie, parfois même de la prostration. Ceci dure en moyenne 24 à 36 heures chez l'adulte, après quoi tout redevient normal. Aucune issue fatale n'a été enregistrée. Cependant, chez l'enfant, les formes sont plus sévères et, chez le nourrisson, les cas mortels ne sont malheureusement pas rares.

Si l'on pratique une culture à partir de l'aliment suspect

ou des selles du malade (Chapman) [18], on trouve toujours un staphylocoque particulier. Celui-ci, pour Chapman [24], est toujours du type doré, coagulant le plasma, fermentant le mannitol et donnant les réactions biochimiques propres aux staphylocoques entérotoxiques.

En tenant compte de ces propriétés, Chapman [18] [25] [28] utilise, pour l'isolement des staphylocoques entérotoxiques dans les selles, des milieux particuliers, dont nous verrons la composition en même temps que celle des autres milieux utilisés au laboratoire.

Le principe actif, retiré des souches de staphylocoques responsables d'empoisonnements, a reçu le nom d'*entérotoxine*.

C'est une substance soluble, ou exotoxine, produite dans les mêmes conditions que les hémolysines.

A. PRODUCTION

Les méthodes destinées à la production d'entérotoxine sont variées. Presque toutes, comme nous l'avons vu pour les hémolysines, sont basées sur leur production dans le milieu de Burnet [9] : milieu d'infusion de viande gélosée, en atmosphère de CO^2.

On peut utiliser le milieu de Dolman [35] [36], dont nous reparlerons dans la partie consacrée à nos travaux personnels. Notons seulement qu'il ne contient pas d'infusion de viande.

Deux auteurs, Favorite et Hammon [41] ont fait à ces milieux le reproche d'être complexes, de contenir des substances antigéniques, non dialysables et d'être difficiles à manipuler comme tout milieu semi-solide.

Ils ont proposé un milieu simple pour la production conjointe d'entérotoxine et d'hémolysine « (1941). Il se compose d'hydrolysat acide de caséine, de glucose, de vitamine B1 et d'acide nicotinique. L'incubation se fait à 37° en atmosphère de CO2 (25 ou 50 %), dans un appareil tournant, pendant six jours.

Surgala [91] a proposé un milieu chimiquement défini,

comprenant des acides aminés, des vitamines, du glucose. Il a étudié l'action de seize acides aminés et a montré que le milieu le plus simple ne contenait que de l'arginine, de la cystine et obligatoirement du glucose.

Le même auteur et Hite (1946) [92] ont donné trois milieux de base, contenant respectivement 2, 6 et 15 amino-acides, des sels inorganiques, du glucose, de l'acide nicotinique, de la thiamine et de l'acide pantothénique. Les cultures, faites avec ce milieu, sont également à 37°, en atmosphère à 20 % de CO^2 et soumises à l'agitation pendant sept jours.

B. PROPRIÉTÉS

1° Physiques.

L'entérotoxine est filtrable et dialysable. Elle est retirée de ces milieux après filtration sur bougies, centrifugation du liquide recueilli et précipitation des autres toxines qu'il contient. Il arrive qu'une partie notable de l'entérotoxine soit retenue : Hammon [58] pense que cela est dû aux grandes dimensions de sa molécule.

Elle est *thermostable :* Une durée de 20 à 30 minutes à 100° ne l'altère pas. Cette propriété est utilisée pour sa purification. Il faut attendre 2 heures pour qu'elle perde toute son activité. Une conservation à basse température ne l'affaiblit qu'au bout de 67 jours, mais ne la détruit pas.

D'après Davison et Dack, elle précipite par le sulfate d'ammonium à saturation. Pour Hammon [58], elle resterait en solution.

L'action des solvants des graisses est différente, selon les auteurs :

Elle serait soluble dans :

Chloroforme, éther (Jordan et Burrows) ;

— Alcool éthylique à 95 % (Hammon) [58] (Davison).

Mais Davison la trouve insoluble dans le chloroforme.

2° Chimiques :

Les acides ne semblent pas avoir une action forte sur l'entérotoxine. Minett a montré qu'elle résistait à l'acide chlorhydrique à pH 5,0.

In vivo, puisque l'homme est sensible à l'absorption de cette toxine par la bouche, il est probable qu'elle résiste à des pH encore plus bas, semblables à ceux de l'estomac. L'entérotoxine a été retrouvée intacte à pH 4,5 (Hammon) [58] et semble résister à l'activité de la trypsine et de la pepsine.

La soude à pH 8,0 et 8,2 ne semble pas avoir d'effets destructifs (Hammon) [58]. Cependant, Woolpert a montré que le chauffage, en présence d'acide chlorhydrique N/100, détruit l'entérotoxine.

Le formol, aux taux employés pour la préparation de l'anatoxine staphylococcique, n'a pas d'effets destructifs sur l'entérotoxine.

L'étude de la constitution chimique de l'entérotoxine, en milieu sans protéine, ne révèle aucune trace d'azote par microméthode de Kjeldhal. Il s'agirait d'une grosse molécule glucidique complexe (Hammon) [58].

C. MISE EN ÉVIDENCE

a) **Il n'existe aucun test quantitatif** pour la mise en évidence de l'entérotoxine. Le dosage de la production d'hémolysines peut être employé à titre de remplacement, puisque la production d'hémolysines et d'entérotoxine a lieu dans les mêmes conditions. Mais une souche produisant un titre élevé d'hémolysine α ou β peut donner un taux très bas d'entérotoxine, active cependant (Favorite et Hammon) [41].

b) **La seule méthode qualitative** *in vivo* pour mettre en évidence l'entérotoxine au laboratoire, est l'ingestion par un animal sensible de l'aliment contaminé, de la souche isolée ou de l'entérotoxine purifiée. Au préalable, il est utile de *neutraliser les autres toxines,* soit par la *chaleur* (30 minutes à 100°), le *formol,* une *antitoxine spécifique.*

On a tenté de se servir d'hommes volontaires, comme l'a

montré Barber, en ingérant une culture de staphylocoques pathogènes; mais la méthode a été abandonnée pour sa gravité. Le singe donne également une bonne réponse.

Dolman, Cockroft et Wilson [35] ont montré que le jeune chat (« kitten ») était un animal très sensible. Ces auteurs ont proposé l'injection par voie intrapéritonéale d'un centimètre cube d'entérotoxine par kilogramme de poids (« kitten-test »).

En 15 minutes à 2 heures, plus fréquemment en 30 minutes des nausées puis des vomissements surviennent. L'animal, les poils hérissés, est parcouru de frissons. La température commence à monter vers 40° ; ce maximum étant atteint seulement en 2 à 4 heures. La diarrhée, bien qu'elle survienne chez la plupart des animaux, peut souvent être de peu d'importance. Le cycle des vomissements peut être de 5 à 60 minutes et durer 2 à 3 heures. En général, 3 à 4 heures après le début des symptômes, le chat paraît très notablement malade et, 24 à 48 heures après, il reprend son allure normale, si l'on a pris soin de le réhydrater copieusement.

Dolman [35] utilise le même chat pour un ou plusieurs tests, séparés par un intervalle de sept jours. Mais Hammon [58] pense que le développement d'une immunité gêne la lecture des résultats, après deux à trois semaines. D'autre part, il [58] reproche à la voie intrapéritonéale de provoquer une irritation locale, donnant des vomissements et de la diarrhée non spécifiques. C'est pourquoi le kitten-test par voie intraveineuse a été préconisé, ce qui permet d'employer des chats adultes. L'injection se fait au-dessus ou au niveau du genou. Une légère pression dans la région inguinale fait gonfler suffisamment la veine.

Avant toute épreuve, il faut s'assurer de *l'état de santé de l'animal*, car il existe une épizootie féline, très commune et à type hautement infectieux, *la Panleucopénie*, avec diarrhée et vomissements (Hammon et Enders). On ne soumettra pas, à la recherche de l'entérotoxine, un chat qui refuse une nourriture carnée, symptôme très net de cette infection.

On a proposé de tester l'entérotoxine sur embryons de poulet.

Des inoculations faites à la surface de la membrane chorio-allantoïde ou directement dans le sac vitellin, sont restées sans résultats.

c) **In vitro,** la mise en évidence de l'entérotoxine a été étudiée, en 1935, par l'auteur américain Stone [89].

Il a constaté que les protéines étaient les seuls ingrédients communs à tous les aliments responsables d'empoisonnements par les staphylocoques. Il a donc proposé une épreuve, basée sur la liquéfaction anaérobie de la gélatine, puisque cette substance protidique relativement simple, très répandue dans les laboratoires, sert de base au diagnostic bactériologique des staphylocoques.

Plus tard, améliorant cette technique, il a proposé la culture des staphylocoques entérotoxiques sur plaques de gélose-gélatine. Après incubation, les plaques sont inondées avec une solution saturée de sulfate d'ammonium et les colonies suspectes s'entourent d'une auréole transparente très nette.

Chapman a modifié cette technique en proposant un milieu qui évite d'immerger les colonies, tout en donnant les mêmes résultats.

Ces milieux ont l'avantage d'être de composition simple, de maniement facile, de lecture rapide et à la portée de tous les laboratoires.

La comparaison des tests de recherche de l'entérotoxine *in vivo* et *in vitro* concorde dans 92,5 % des cas.

CARACTÈRES BIOCHIMIQUES

Les caractères, que nous venons de voir, sont les caractères majeurs des staphylocoques pathogènes. Ceux que nous allons voir, à présent, sont d'une valeur plus discutée. Cependant, il semble bien que leur mise en évidence, simple et facile, permette déjà de tirer des conclusions sur le pouvoir pathogène de la souche étudiée.

Nous les envisagerons dans l'ordre suivant :

1° Fermentation du mannitol.

2° Epreuve au violet cristallisé.
3° Liquéfaction de la gélatine.
4° Croissance en milieu hypersalé.

1° Fermentation du mannitol.

La dégradation du mannitol en acides (Gordon, 1904) a été longtemps considéré comme uniquement due aux staphylocoques *pathogènes* (caractère présenté par des souches pigmentées, issues de malades atteints de staphylococcies).

Cependant, de nombreux staphylocoques non pathogènes fermentent également ce polyalcool (Winslow, Rothberg et Parsons) [100], (Chapman) [19], (Cruickshank) [32].

La mise en évidence des souches fermentant le mannitol est simple. Il suffit de les ensemencer dans de l'eau peptonée ou sur gélose, contenant un petit volume d'une solution à 1 % de mannitol et un indicateur coloré. Après incubation à 37° pendant 24 heures, la fermentation se traduit par un changement de teinte de l'indicateur vers l'acidité.

Evans [39] a proposé la fermentation anaérobie du mannitol comme beaucoup plus spécifique des staphylocoques pathogènes.

2° Epreuve au violet cristallisé.

En 1935, les auteurs américains Chapman et Berens [14] cherchaient un moyen de reconnaître les pigmentations douteuses de certaines souches hémolytiques. Cette pigmentation leur apparaissait, parfois, difficile à caractériser. Ils ont été amenés à rechercher l'action de différents corps chimiques sur les cultures des souches, pigmentées ou non.

Sur un milieu contenant du *crystal violet* ou *violet cristallisé*, à la concentration de 1/330.000, les souches poussent bien. Les colonies s'entourent d'un cercle violet, lorsqu'il s'agit de Staphylocoques dorés; les colonies de staphylocoques blancs pathogènes sont entièrement violettes et les colonies non pathogènes conservent leur aspect normal, incolore.

Chapman et Berens [14] ont proposé un milieu, dont nous donnerons plus loin la formule, sur lequel la différenciation est facile.

L'Institut Pasteur de Paris a adopté une formule plus simple de gélose ordinaire contenant du violet cristallisé à une concentration plus faible (1/4.000.000).

L'augmentation du taux de cristal violet est bactériostatique pour les staphylocoques (1/100.000 et au-dessus) en inhibant le métabolisme de l'acide glutamique à l'intérieur de la cellule (Gale) [43].

D'après Chapman [14], les résultats donnés par le milieu au crystal violet seraient parallèles à l'épreuve de la coagulase dans 93 % des cas.

3° Liquéfaction de la gélatine.

Les auteurs anglo-saxons considèrent *la vitesse* de liquéfaction de la gélatine, par les staphylocoques, comme un test de pouvoir pathogène (Knott) [66].

Cette méthode consiste à ensemencer un tube de gélatine en culot par piqûre centrale. L'orifice libre du tube est fermé à la paraffine ou par un capuchon, pour éviter la dessication du milieu. L'incubation a lieu à 22°.

Une liquéfaction évidente en 72 heures est une preuve de pouvoir pathogène élevé. Les probabilités décroissent avec le temps : la plupart des staphylocoques non pathogènes ne liquéfiant pas la gélatine au delà d'une certaine limite (20e jour).

4° Croissance en milieu hypersalé.

En plus des nombreux caractères vus précédemment, les staphylocoques pathogènes possèdent celui de cultiver en milieu très concentré en chlorure de sodium.

En effet, reprenant les travaux effectués en 1942 par l'auteur allemand Koch, Chapman [23] a montré la résistance des staphylocoques aux concentrations de chlorure de sodium.

Il a remarqué qu'à un taux optimum de 75 grammes par litre :

— Les staphylocoques étaient *seuls* à pousser, à part quelques bacilles sporulés et quelques entérocoques;

— La *pigmentation* des souches était plus éclatante;

Les cultures se maintenaient *pures,* sans risque de souillure ;

— Le pouvoir de coaguler le plasma était *exalté ;*

— Qu'il n'y avait pas de *dissociation* des caractères pathogènes, après conservation des souches sur ce milieu.

Cette découverte a d'importantes conséquences dans l'isolement des staphylocoques, quelle que soit leur origine (produits pathologiques, aliments...).

Chapman a mis ces caractères largement à profit dans les milieux qu'il a proposés pour l'isolement et le diagnostic des staphylocoques pathogènes.

LES MILIEUX USUELS D'ÉTUDE DES STAPHYLOCOQUES PATHOGÈNES AU LABORATOIRE

Pour ne pas encombrer l'étude théorique des caractères bactériologiques *modernes* des staphylocoques pathogènes, nous en avons délibérément écarté toute formule complexe de milieux de culture.

Nous reprendrons parmi ces formules, qui sont nombreuses, celles dont la composition est la plus facile à réaliser au laboratoire.

Cet exposé, forcément très technique, comprendra :

— Les milieux convenant à l'étude de tous les staphylocoques pathogènes ;

— Les milieux convenant à la recherche des staphylocoques entérotoxiques.

A. LES MILIEUX CONVENANT A LA RECHERCHE DE TOUS LES STAPHYLOCOQUES PATHOGÈNES

Les milieux convenant à la recherche des staphylocoques pathogènes peuvent être divisés en :

— Milieux d'isolement et de diagnostic,
— Milieux de conservation.

1° Milieux d'isolement et de diagnostic.

Les deux premiers milieux de Chapman [19] étaient :

a) La gélose lactosée au bleu de bromothymol;

b) La gélose mannitée au rouge de phénol.

a) **Gélose lactosée au bleu de bromothymol :**

Elle a été depuis abandonnée par lui et transformée pour l'isolement des staphylocoques entérotoxiques, où nous la retrouverons.

b) **Gélose mannitée au rouge de phénol :**

D'abord employée avec une formule sans chlorure de sodium, elle a été modifiée à la suite des travaux de Chapman sur la croissance des staphylocoques en milieu hypersalé.

Sa formule, en 1945, était la suivante :

Nutrient broth (Difco).....	8 g.
Proteose peptone (Difco)...	9 g.
d-mannitol.	10 g.
Chlorure de sodium.....	75 g.
Rouge de phénol.....	0 g. 025
Bacto-agar (Difco).	15 g.
Eau distillée (pH 7).....	1.000 cm^3

Dissoudre en chauffant. Amener à pH 7. Répartir en tubes, Stériliser à l'autoclave à 120° pendant 30 minutes.

Au moment de l'emploi, couler en boîtes de Petri.

Le produit à examiner est ensemencé en surface. L'incubation a lieu à 37° pendant 20 à 24 heures.

Sur ce milieu, normalement rouge, les souches fermentant le mannitol donnent de grosses colonies jaunes, entourées d'une auréole jaune; au contraire, les colonies qui ne fermentent pas le mannitol sont petites, fines et rouge.

La flore staphylococcique de certains produits pathologiques, très peu riches en germe (lait, selles, produits alimentaires...) demande à être enrichie avant d'être isolée.

— *Milieu d'enrichissement :*

Buttiaux et Brogniart [11] recommandent l'emploi d'une formule de Chapman, modifiée de la façon suivante :

Une dilution très épaisse de selles (1 à 2 g. dans 10 cm^3 d'eau distillée) ou du produit alimentaire suspect finement broyé dans 10 cm^3 d'eau distillée ou 10 cm^3 du lait à étudier sont mis dans un tube à essais contenant 10 cm ^{3}du milieu suivant :

Nutrient broth (Difco).....	16 g.
Proteose peptone (Difco)..	10 g.
Chlorure de sodium.....	150 g.
Lactose.	15 g.
Bacto-agar (Difco).	1 g.
Eau distillée (pH 7).....	1.000 cm^3

Dans cette formule, 8 g. de « *Nutrient broth* » peuvent être remplacés par :

Extrait de viande de bœuf.	3 g.
Bonne peptone trypsique...	5 g.

Le pH est amené à 7,4. Répartir en tubes à raison de 10 cm^3 dans chaque tube. Stériliser à l'autoclave à 120° pendant 20 minutes.

Après ensemencement, la concentration finale du milieu en ClNa est donc de 75 g. ‰.

L'incubation se fait à 37° pendant 36 heures. Les staphylocoques sont seuls à se développer dans ce milieu. Une goutte de culture enrichie est étalée à la surface du milieu d'isolement : *gélose mannitée au rouge de phénol* et le processus est identique à celui décrit précédemment.

c) **Milieu au crystal violet :**

La formule donnée par Chapman [14] est la suivante :

Beef extract (Difco)	3 g.
Proteose peptone (Difco)	5 g.
Lactose	10 g.
Bacto-agar (Difco)	15 g.
Crystal violet	0 g. 0033
Eau distillée	1.000 cm^3

Répartir en tubes. Stériliser à l'autoclave à 120° pendant 20 minutes.

Après ensemencement et incubation à 37° pendant 36 heures, les souches dorées sont cerclées de violet, les souches blanches pathogènes sont violettes, les souches blanches non pathogènes conservent leur coloration initiale.

2° Milieu de conservation.

La conservation des souches, comme nous l'avons vu, se fait sans aucune altération de leurs caractères, sur le milieu suivant :

Nutrient broth (Difco)	8 g.
Proteose peptone (Difco)	9 g.
Chlorure de sodium	75 g.
Lactose	10 g.
Bacto-agar (Difco)	15 g.
Eau distillée	1.000 cm^3

Amener à pH 7. Répartir et stériliser à l'autoclave à 120° pendant 20 minutes. Les tubes contenant ce milieu doivent être inclinés.

Après ensemencement, les tubes sont portés à 37° de 24 à 48 heures. Il est bon de capuchonner les tubes pour éviter la dessication du milieu.

B. LES MILIEUX CONVENANT A LA RECHERCHE DES STAPHYLOCOQUES ENTÉROTOXIQUES

Les milieux groupés dans ce chapitre sont destinés à l'isolement et au diagnostic.

1° Milieux d'isolement.

A partir des selles, l'isolement des staphylocoques entérotoxiques se fait sur *la gélose lactosée au bleu de bromothymol et au tellurite de potassium* (Chapman, 1944) [18].

Beef extract (Difco).....	3 g.
Proteose peptone (Difco) ..	5 g.
Lactose.	10 g.
Bleu de bromothymol.....	0 g. 17
Eau distillée.	1.000 cm³

Dissoudre dans l'eau froide. Faire bouillir 2 à 3 minutes. Stériliser en gros tubes à l'autoclave à 120° pendant 20 minutes. Au moment de l'emploi, couler en boîtes de Petri.

A la surface de la gélose, on verse 0,1 cm³ d'une solution de tellurite de potassium à 0,1 %. Ne pas chauffer le milieu après addition de tellurite.

Ensemencer le produit à examiner. Mettre à l'étuve à 37°, pendant 24 heures. Les colonies qui ont fermenté le lactose sont entourées d'une auréole jaune, qui tranche sur le fond bleu du milieu.

Ce milieu empêche la culture des coliformes, mais les streptocoques et les entérocoques ne sont pas inhibés.

2° Milieux de diagnostic.

a) **Le milieu à la gélatine de Stone :**

Stone [89], en 1935, utilise l'action des staphylocoques entérotoxiques sur la gélatine dans les conditions suivantes:

De la gélatine (Difco) est mise à sécher dans un récipient large, à l'étuve à 37° pendant 5 jours. La mélanger alors à de

l'eau distillée à raison de 15 % avec de l'extrait de bœuf (3 %). Chauffer la gélatine jusqu'à dissolution. Ne pas ajuster le pH. Ramener à 45° sans agiter. Remonter à 90-100° pendant 20 minutes. Agiter quelquefois. Compléter le poids avec de l'eau. Filtrer. Répartir à raison de 4 cm³ par tube. Boucher au coton.

Stériliser à 120° pendant 15 minutes.

A la sortie de l'autoclave, mettre en glacière. Après solidification de la gélatine, fermer au bouchon et à la paraffine.

L'ensemencement se fait par piqûre centrale. Faire un témoin non ensemencé. Incuber à 37°. Lire les résultats exactement à la fin des 24 heures en portant tous les tubes dans l'eau à 21°, jusqu'à ce qu'un témoin non ensemencé soit pris. Tout début de liquéfaction est une preuve de staphylocoque entérotoxique.

Plus tard (1938), Stone a proposé un autre milieu, basé sur la même propriété :

Gélatine	30 g.
Extrait de bœuf	30 g.
Gélose en poudre	15 g.
Eau distillée	1.000 cm³

Ce milieu, préparé comme tout autre milieu, sera ajusté à pH 6,8 et réparti en boîtes de Petri la veille de l'emploi, pour éviter un excès d'eau de condensation.

Après ensemencement des souches, les boîtes sont mises à l'étuve à 37° pendant 24 heures. A la fin de l'incubation, la surface des boîtes est inondée avec 5 cm³ d'une solution saturée de sulfate d'ammonium. Les résultats sont lus à partir de cinq minutes : les colonies entérotoxiques s'entourent d'une auréole transparente (réaction de Stone positive).

b) Chapman [25], en 1946, a présenté un milieu qui tente de grouper toutes les recherches concernant les staphylocoques pathogènes, entérotoxiques ou non. Sa formule est la suivante (milieu n° 110) :

Eau distillée	1.000 cm³
d-mannitol	10 g.
Bacto-tryptone (Difco)	10 g.
Bacto-agar (Difco)	15 g.

Chlorure de sodium.....	75 g.
Lactose.	2 g.
Bacto-yeast extract.	2 g. 5
Phosphate dipotassique anhydre.	5 g.
Bacto-gélatine (Difco).	30 g.

Ajuster à pH 7,0.

Ce milieu doit être incubé à 30° (CHAPMAN) [27]. La réaction de Stone se fait comme sur le milieu précédemment décrit, en inondant les colonies avec une solution saturée de sulfate d'ammonium. Mais cette manipulation est délicate et la présence de sulfate d'ammonium rend difficile l'isolement de la colonie. De plus, la plaque de milieu est impropre à toute épreuve ultérieure (recherche de la fermentation du mannitol...).

c) *C'est pourquoi* CHAPMAN a modifié ce milieu en y incorporant le sulfate d'ammonium. Ce corps donne une acidité supplémentaire, qui doit être neutralisée par l'addition d'une petite quantité de soude. Ceci libère de l'ammoniac, mais la croissance des staphylocoques n'est pas perturbée.

Sur ce milieu, les colonies de staphylocoques sont beaucoup plus petites que sur le milieu n° 110, mais ce défaut est éliminé en enlevant le lactose et en réduisant le chlorure de sodium à 55 g. par litre.

Ce milieu modifié (milieu de Chapman-Stone) [28] a la composition suivante (1948) :

Eau distillée.	1.000 cm³
d-mannitol.	10 g.
Bacto-tryptone (Difco). . .	10 g.
Bacto-agar (Difco).	15 g.
Chlorure de sodium.....	55 g.
Bacto-yeast extract.	2 g. 5
Phosphate dipotassique anhydre.	5 g.
Bacto-gélatine (Difco). . . .	30 g.
Sulfate d'ammonium.	75 g.
Soude à 10 %	6 cm³

Stériliser à l'autoclave à 120° pendant 10 minutes. Quand le milieu est encore chaud, agiter pour disperser le précipité. Au moment de l'emploi, répartir en boîte de Petri. Si le milieu est trop froid, il sera grumeleux et rempli de bulles d'air. Eviter de laisser les boîtes sur une surface froide pendant la solidification du milieu afin d'éviter l'apparition de grumeaux.

Lorsqu'il est convenablement préparé, le milieu est uniformément opaque, sans grumeaux. Il est translucide lorsqu'il est chaud, mais redevient opaque en refroidissant.

Les souches sont incubées à 30°, pendant 48 heures.

La pigmentation est très développée sur ce milieu;

— *Les colonies entérotoxiques* sont entourées d'une auréole transparente;

— *Pour l'épreuve de la coagulase*, prélever une colonie et l'émulsionner dans du plasma;

— *Pour la fermentation du mannitol*, déposer une goutte d'une solution de rouge de bromocrésol à 0,4 % à l'endroit où a été prélevée la colonie destinée à l'épreuve de la coagulase: tout changement de teinte prouve que le mannitol a été fermenté.

Ces deux derniers milieux, par leur simplicité, permettent le diagnostic rapide de tous les staphylocoques pathogènes ou non. Leur emploi dans les épidémies d'empoisonnements alimentaires à staphylocoques paraît recommandé au laboratoire.

II. CARACTÈRES SÉROLOGIQUES

Des essais ont été faits pour savoir s'il existait des rapports entre les caractères sérologiques des staphylocoques et leur pouvoir pathogène.

Les caractères sérologiques ont été étudiés au moyen de trois épreuves différentes :

— Agglutination,
Précipitation,
— Action du bactériophage.

Ce plan correspond assez sensiblement à la progression des recherches. Tout au début de l'étude des caractères sérologiques des staphylocoques, les auteurs ont cherché à associer les examens culturaux et biochimiques avec les épreuves immunologiques.

En 1922, Julianelle avait distingué trois groupes sérologiques différents et deux sous-groupes au moyen des épreuves d'*agglutination*. Ces groupes étaient sans rapport avec les autres caractères des staphylocoques.

En 1922 également, Hine, par les méthodes d'*agglutination* avec des sérums absorbés, trouve deux groupes :

I. *Staph. pyogenes* (trois types sérologiques) ;

II. *Staph. epidermidis* (deux types sérologiques).

Il constate que cette agglutinabilité varie de souche à souche.

Lancefield, en 1925, montre que la protéine du staphylocoque possède des antigènes communs avec ceux des streptocoques et des pneumocoques.

Burky (1933), par les épreuves de *précipitation*, distingue trois groupes en fonction du pouvoir pathogène pour le lapin.

D'autre part, Julianelle et Wieghard (1933) [64], par les mêmes épreuves de *précipitation*, distinguent par l'étude des polysaccharides staphylococciques deux groupes :

— Le groupe A : pathogène,

— Le groupe B : non pathogène.

Et ils concluent en disant qu'aucun glucide n'a stimulé la formation d'anticorps.

Yonemura (1936), au moyen des sérums absorbés et des tests d'agglutination, distingue neuf types spécifiques.

Thompson et Khorazo (1937), en comparant les épreuves de précipitation, la fermentation du mannitol, les hémolysines, la pigmentation et la production de coagulase déterminent quatre groupes.

Ces études n'apportent aucune unité à la classification sérologique des staphylocoques.

En 1938, Cowan montre par des réactions de précipitation que la majorité des staphylocoques pyogènes font partie d'un groupe sérologique correspondant au type A de Juliannelle

et que le plus grand nombre des staphylocoques saprophytes font partie du groupe B, du type B de Juliannelle. Il décrivit plus tard deux autres groupes mais sa classification laisse malgré tout une proportion de staphylocoques indéterminés, dont il fait un cinquième groupe.

Simplifiant ses techniques de recherches sérologiques, le même auteur, au moyen d'une méthode d'agglutination sur lame (1939) [31], décrit trois types, I, II, III, et un groupe de souches « atypiques ».

Christie et Keogh (1940) [29], employant la technique d'agglutination sur lame de Cowan, classent les souches de staphylocoques pathogènes en dix types basés sur des agglutinogènes majeurs et mineurs. Bien qu'ils emploient des sérums absorbés, ils obtiennent encore des réactions croisées, mais se fient aux réactions majeures pour l'identification.

Verwey (1940) prépare une fraction protéinique spécifique de type, différente du polysaccharide de Juliannelle et Wieghard. Sa méthode d'extraction est trop compliquée pour être utile dans la différenciation pratique des types de staphylocoques.

Par la méthode de Cowan, Miss Hobbs (1948) [62] identifie 74 % de souches dans une étude portant sur 1.552 staphylocoques. Sept types sérologiques spécifiques et un moins spécifique ont été reconnus. Elle attribue une valeur moindre aux réactions de précipitation.

Pendant ces dernières années, la découverte de *bactériophages actifs* contre les staphylocoques a ouvert la voie à une seconde méthode de différenciation de types.

Pour Burnet et Lush, cette lyse permettrait de différencier trois types parmi les staphylocoques pathogènes.

Fisk ne rencontre d'action bactériophagique que contre les staphylocoques pathogènes.

Wilson et Atkinson (1945) [99], par la méthode du bactériophage, reconnaissent vingt et un types et sous-types sans pouvoir classer toutes les souches.

La comparaison des classifications sérologiques et bactériologiques ne montre pas un parallèlisme absolu (Hobbs) [62],

mais leur application associée dans l'étude des épidémies d'infections staphylococciques a montré qu'elles étaient de grande valeur pour le dépistage des origines et des contaminations.

Par opposition avec les méthodes d'étude biochimique des staphylocoques, la complexité des recherches sérologiques et bactériophagiques rend leur mise en pratique assez délicate pour les laboratoires cliniques. Mais ces méthodes de classification ont conduit à des conclusions épidémiologiques et bactériologiques de grande valeur étant donné leur spécificité.

CHAPITRE II

TENTATIVES DE CLASSIFICATION

La différenciation certaine entre staphylocoques pathogènes et non pathogènes est recherchée depuis longtemps par les bactériologistes.

Les moyens de reconnaître la valeur pathogène d'un staphylocoque reposaient, à l'origine, sur :

L'histoire clinique du malade,
La pigmentation du germe isolé,
Son inoculation à l'animal.

De ces trois caractères, le dernier est le meilleur. Malheureusement, il est souvent d'interprétation délicate.

L'origine de la souche ne permettait pas d'expliquer toujours les cas cliniques. D'autre part, s'il était classique de considérer comme hautement pathogène un staphylocoque doré retiré d'une lésion staphylococcique typique, la présence d'un staphylocoque blanc dans une hémoculture, par exemple, était considérée comme une souillure (sauf répétition des hémocultures positives).

Mais différents auteurs se sont attachés à montrer que la pigmentation est un caractère susceptible d'apparaître et de disparaître dans certaines conditions *in vitro* (Rodet et Courmont) (Netter). Le pigment lui-même ressemblant au carotène n'aurait d'après eux aucun rapport avec le pouvoir pathogène ou antigènique (Panton, Valentine, Dix) (Wright).

De même, on a prétendu avoir transformé une souche non pigmentée en souche virulente, soit par culture prolongée en sérum provenant d'une souche dorée et pathogène, soit par inoculations successives à un grand nombre de lapins.

Cette incertitude du caractère, soi-disant pathogène, le plus facile à constater, la pigmentation, explique en partie les efforts des bactériologistes pour trouver des épreuves fidèles et faciles, reposant sur d'autres bases.

Ces bases ont été apportées par l'étude des caractères modernes des staphylocoques et comprennent, nous l'avons vu, les recherches suivantes :

Coagulase,
- Hémolysines,
- Fibrinolysine,
- Entérotoxine,
- Fermentation du mannitol,
- Pouvoir de cultiver en milieu hypersalé,

Liquéfaction de la gélatine.

Pour essayer de dégager une opinion valable, nous allons reprendre, sous forme de tableaux, les principaux résultats que nous avons rencontrés en étudiant les travaux étrangers et français, concernant les staphylocoques pathogènes.

CHAPMAN, 1934 [13] :

— Souches examinées : 2.542.
Origine : Non indiquée.
Epreuves :

Pigmentation - coagulase - hémolyse - agglutination - injection intraveineuse et intradermique à l'animal.

Résultats bruts :

Staph. albus : 1.852..... 13,4 % H+ et 11,9 % C+
Staph. aureus : 690..... 51,7 % H+ et 88,0 % C+

TABLEAU II

Germes	Coagulase	Hémolysine	Innoculation à l'animal (mort en 10 jours)
Staph. albus	+	0	88 %
	0	+	23 %
	0	0	25 %
Staph. agglutinant	0	0	22 %
Staph. aureus	+	0	100 %
	0	+	100 %

CONCLUSIONS.

— Le pouvoir hémolytique d'une souche de staphylocoque est insuffisant comme seul test de pouvoir pathogène de cette espèce.

— La détermination de la coagulase est un test supplémentaire important au test d'hémolyse. Les souches coagulase-positives sont habituellement pathogènes, sans tenir compte de leur activité hémolytique.

— Les souches coagulase-positives sont habituellement pathogènes, sans tenir compte de leur pigmentation.

— D'autre part, l'importance de l'épreuve d'hémolyse dépend de la détermination soigneuse du pigment produit par la souche.

Les souches blanches hémolytiques et coagulase-négatives sont probablement non pathogènes, mais les souches dorées hémolytiques sont habituellement pathogènes sans tenir compte de leur coagulase.

— Pour caractériser des types toxiques de staphylocoques, il est nécessaire de faire au moins les tests d'hémolyse, de coagulase et une détermination soigneuse de la pigmentation. Par une détermination rigoureuse de ces trois réactions, il est possible d'estimer la toxicité d'une souche avec une haute précision.

Cruickshank, 1937 [32] :

Souches examinées : 170.
Origine : Lésions - nez.
— Epreuves :

Coagulase - mannitol - lait - gélatine - α-hémolysine - pouvoir pathogène in vivo.

Résultats bruts :

120 staph. dorés, sauf un, étaient coagulase-positifs.
20 staph. blancs, ayant été cultivés avec des dorés, étaient coagulase-positifs.
30 staph. blancs purs, étaient coagulase-négatifs.
38 souches virulentes sur 40 étaient hémolytiques.

Tableau III

Souches (20 dans chaque groupes)	Mannitol	Coagulase positive	Lait	Gélatine	Hémolysine	Pouvoir Pathogène
Dorés	20	20	20	17	19	11/12
Blancs variants	20	20	20	18	19	10/12
Blancs purs	11	0	9	6	0	0/12

Conclusions.

La coagulase est produite par les staphyloçoques dorés et les blancs variants. A cause de sa constance et de sa mise en œuvre facile, la recherche de la coagulase est recommandée comme le meilleur test du pouvoir pathogène des staphylocoques. La présence de l'α-hémolysine chez 38 des 40 souches virulentes testées et chez aucune des saprophytes fait penser que la production d'α-hémolysine n'est donnée qu'aux staphylocoques pathogènes. La recherche de cette hémolysine α, pour les souches saprophytes, sur plaques de gélose au sang de

lapin, ne me semble pas comparable à sa recherche en milieu liquide, car ces mêmes souches peuvent produire une zone claire sur gélose au sang, sans pour cela produire une hémolysine soluble démontrable.

HALLMAN, 1937 [57] :

— Souches examinées : 233.
— Origine : Nez.
— Epreuves :
Coagulase - mannitol - hémolyse - crystal violet.

— Résultats bruts :

— Staph. doré orange : Dans 81 % des cas coagulase-positifs.

Staph. citrin : Dans 17 % des cas coagulase-positifs.

— Staph. blanc : Tous coagulase-négatifs, sauf 6.

— Production de coagulase et fermentation du mannitol concordent dans 90 à 97 % des cas.

— Production de coagulase et production d'α-hémolysine concordent dans 67 % des cas.

— Parmi les souches hémolytiques : 32,8 % étaient coagulase-négatives.

— Parmi les souches non hémolytiques : 20 étaient coagulantes, 21 ne l'étaient pas.

— Coagulase et crystal violet concordent dans 88,03 % des cas.

CONCLUSIONS.

Bien que la recherche de la coagulation du plasma soit la méthode de choix dans le diagnostic des staphylocoques pathogènes, la fermentation du mannitol, la réaction du crystal violet et la production d'hémolysine sont aussi des méthodes de confirmation dans une telle recherche.

Gillepsie, Devenish et Cowan, 1939 [50] :

— Souches examinées : 310.
— Origine : Téguments nez.

— Epreuves :

Pigmentation - mannitol - coagulase - hémolyse - agglutination.

— Résultats bruts :

112 souches étaient dorées, coagulase-positives, hémolytiques et mannitol-positives.

198 souches étaient blanches ou citrines, coagulase, hémolysine et mannitol-négatives.

Tableau IV

Souches	Nombre	Hémolysine		Coagulase		Mannitol		Staph. pyogène
		+	—	+	—	+	—	
dorées	130	112	18	112	18	114	16	112
blanches	102	0	102	0	102	60	42	0
citrines	78	0	78	0	78	51	27	0
Hémolysine								
+	112			112	0	110	2	112
—	198			0	198	115	83	0
Coagulase								
+	112					110	2	112
—						115	83	0

Conclusions.

1° La coagulase est le test le plus simple et le meilleur pour étudier le pouvoir pathogène potentiel.

2° La pigmentation est de valeur limitée.

3° Il y a corrélation complète entre la production d'α-hémolysine et de coagulase.

Cowan, 1939 [31] :

— Souches examinées : 105.
— Origine : Non indiquée.
— Epreuves :

Epreuves sérologiques étudiées parallèlement avec les *réactions biologiques* classiques, sauf l'hémolyse.

— Résultats bruts :

Deux tiers des *Staph. pyogenes* peuvent être divisés en trois types sérologiques, alors que la classification du reste présente des difficultés du fait de leurs réactions atypiques avec les sérums absorbés.

Tableau V

	Types Sérologiques				
	I	II	III	Atypiques	Inclassés
S. pyogènes	28	16	15	26	1
S. épidermidis	0	0	0	0	15

Christie et Keogh, 1940 [29] :

— Souches examinées : 220.
— Origine : Lésions - nez.

— Epreuves :

Coagulase - hémolyse - mannitol - épreuves sérologiques.

— Résultats bruts :

156 souches sur 220 étaient coagulase-positives.
64 souches sur 220 étaient coagulase-négatives.

Coagulase :

Sur 156 souches coagulase-positives :
136 étaient dorées,
11 étaient *serin.*
3 étaient citrines,
6 étaient blanches.

Sur 64 souches cogulase-négatives :

10 étaient dorées,
2 étaient *serin*.
2 étaient citrines,
50 étaient blanches.

Hémolysine :

Sur 156 souches coagulase-positives :
141 étaient hémolytiques (123 α) (18 $\alpha\beta$).
15 étaient Ho ou H±.

Sur 64 souches coagulase-négatives :

46 étaient non hémolytiques.
18 étaient douteuses.

Mannitol :

Sur 94 souches coagulase-positives : 94 fermentaient le mannitol,

Tableau VI, — Caractères bactériologiques

Coagulase-positives	Pigment	Hémolysines		Mannitol
		+	−	
156	D : 136 S : 11 C : 3 B : 6	141	15	94/94
Coagulases-négatives				
64	D : 10 S : 2 C : 2 B : 50	46	18	

Tableau VII. — Caractères sérologiques

Origine des souches	Types 1-3	Types 4-9
nez, gorge, expectorat	24	5
ostéomyélite hémoculture	9	24
furoncles	8	16

Conclusions.

La production de coagulase est le test le plus simple actuellement pour déterminer le pouvoir pathogène d'une souche de staphylocoque. Aucun autre ne peut donner une complète certitude.

Les types sérologiques de staphylocoques, retirés des furoncles et des lésions staphylococciques graves, diffèrent habituellement de ceux trouvés dans le nez et la gorge et sont plus complexes au point de vue antigénique.

Pillet, 1948 [82] :

— Souches examinées : 425.
— Origine: Lésions humaines, origine nasale, origine animale.

Epreuves :

Coagulase - hémolyse - fibrinolyse - mannitol - crystal violet - inoculation à l'animal.

— Résultats :

TABLEAU VIII

Nombre de souches suivant l'origine	Hémolysine α		Hémolysine α β	Hémolysine β	Coag. +	Fibrin. +	Pigment
	H + sur sang de lapin	H + sur sang de mouton					
307 souches issues de lésions humaines	285	238	1	0	280	225/265	215 D 91 B 1 C
109 souches humaines d'origine nasale ou cutanée	90	38	0	0	46	52	31 D 75 B 3 C
9 souches pathogènes d'origine animale	0	0	7	2	9	0	5 D 4 B

CONCLUSIONS.

— L'épreuve de la coagulase doit toujours être recherchée, parce qu'elle est simple et facile à mettre en évidence.

— La pigmentation est un mauvais témoin du pouvoir pathogène, puisqu'un grand nombre de staphylocoques blancs élaborent la coagulase.

— La recherche des hémolysines devra être menée parallèlement à l'épreuve de la coagulase, sur gélose au sang de lapin et sur gélose au sang de mouton. Elle permet d'obtenir une évaluation rapide et fidèle du pouvoir pathogène.

— La fermentation du mannitol est une épreuve moins fidèle que la coagulase et l'hémolyse.

— La recherche du pouvoir pathogène, chez le lapin, est étroitement parallèle aux épreuves de la coagulase et du mannitol.

De la comparaison de tous ces travaux, il ressort que la notion de pouvoir pathogène pour les staphylocoques est fournie par ces épreuves de laboratoire de valeur différente :

— Il est maintenant admis que le critérium du pouvoir pathogène est, pour les staphylocoques, la possibilité de *coaguler le plasma* d'homme ou de lapin, dans des conditions précises.

En règle générale, les staphylocoques coagulase-positifs seront seuls considérés comme pathogènes, sans tenir compte de leur pigmentation.

— La production de *fibrinolysine* est étroitement liée à la production de coagulase.

— L'*hémolyse* ne doit pas être mise en parallèle de façon trop absolue avec le pouvoir pathogène, surtout pour les techniques de recherche sur boîtes de gélose au sang.

La détermination de la pigmentation de la souche testée est très importante dans la pratique de cette épreuve.

— Le pouvoir de *fermenter le mannitol* est un caractère des staphylocoques pathogènes.

Cependant, des staphylocoques non pathogènes fermentent également ce polyalcool dans la proportion de 11 à 55 % selon les auteurs.

— L'épreuve au *crystal-violet* donne, elle aussi, des résultats très proches de ceux de la coagulase.

— La *gélatine* est liquéfiée par les staphylocoques pathogènes.

— Les épreuves *sérologiques*, difficiles à exécuter, sont encore discutées.

— *L'inoculation à l'animal* reste une épreuve de choix.

CHAPITRE III

ACTION DES ANTIBIOTIQUES

L'avènement et l'essor des antibiotiques dans la lutte contre les infections bactériennes sont inséparables de l'étude des staphylocoques.

C'est, en effet, en remarquant l'action empêchante exercée par une moisissure sur la pousse de colonies de staphylocoques pyogènes, que FLEMING fit en 1928 sa découverte retentissante. Le principe antibiotique isolé et purifié par ABRAHAM, CHAIN, FLOREY et les chercheurs de l'Ecole d'Oxford constitue à l'heure actuelle le meilleur agent thérapeutique contre les staphylocoques.

Or, les auteurs se sont très vite aperçus que tous les staphylocoques n'étaient pas également sensibles à l'action antibactérienne de la pénicilline. L'extension de la pénicillinothérapie a conduit à rechercher systématiquement la sensibilité à l'antibiotique des staphylocoques pathogènes pour l'homme et l'on s'est rendu compte de la proportion croissante des souches insensibles à la pénicilline. La possibilité de voir des germes primitivement sensibles devenir résistants, risque de constituer un sérieux obstacle à l'extension de cette précieuse méthode de traitement.

Heureusement, ces germes dits « pénicillino-résistants » paraissent conserver leur sensibilité aux autres agents antibiotiques, en particulier à la streptomycine.

Nous limitant à l'étude de l'action des antibiotiques sur les staphylocoques pathogènes, nous nous proposons de rappeler brièvement l'action de la pénicilline et de la streptomycine sur ces germes. Nous laisserons de côté la chloromycétine et l'auréomycine pour envisager seulement les deux antibiotiques actuellement employés en pratique courante dans le traitement des staphylococcies.

I. LA PÉNICILLINE

Etant donné les différences de sensibilité des staphylocoques à la pénicilline, il est important de préciser le taux antibiotique

de chaque souche et de poser le problème des staphylocoques pénicillino-résistants.

1° Méthodes de détermination de la sensibilité a la pénicilline.

Toutes les techniques sont basées sur le même principe : étudier la pousse du germe sur des milieux variables additionnés de pénicilline à des concentrations variables.

Les méthodes proposées sont nombreuses; seuls les titrages bactériologiques nous retiendront. On peut les classer en deux groupes :

Méthodes de diffusion en gélose;
— Méthodes de dilutions en bouillon.

a) **Méthodes de diffusion en gélose** : On cultive le germe sur une boîte de gélose uniformément ensemencée. On dépose une certaine quantité de pénicilline à une concentration donnée, soit dans une « cup » creusée dans la gélose (Fleming), soit dans un cylindre métallique ou en verre (Heatley), soit encore sur un disque de papier buvard stérile (Vincent).

Le diamètre de la zone d'inhibition permet d'apprécier la sensibilité du germe.

b) **Méthodes de dilutions en bouillon**: On réalise des dilutions croissantes de l'antibiotique en milieu liquide uniformément ensemencé avec le germe à étudier.

On peut apprécier la pousse :

— Par la turbidité du milieu;
— Par l'hémolyse dans un milieu au sang (Rammelkamp) ;
Par le virage d'un indicateur coloré dans un milieu sucré (Sureau).

Les résultats obtenus avec les staphylocoques montrent que cette espèce est dans l'ensemble très sensible à la pénicilline. Celle-ci exerce, en effet, sur les germes en voie de multiplication ou se trouvant dans des conditions permettant leur développement, une action bactéricide à une concentration suffi-

sante et une action seulement bactériostatique à une concentration moindre.

Les taux moyens indiqués par les auteurs varient entre 0,006 et 0,2 unités-Oxford cm³. La sensibilité du staphylocoque-Oxford, habituellement choisi comme germe-étalon, est de l'ordre de 0,03 u. o./cm³.

Mais toutes les souches sont loin d'avoir la même sensibilité. Il en existe dont la croissance n'est inhibée que par une concentration très élevée de l'ordre de 800 u. o./cm³, par exemple.

C'est pour ces souches que l'on est amené à parler de pénicillino-résistance. Leur fréquence paraît croissante en pathologie humaine et nous semble mériter une étude plus approfondie.

2° Les staphylocoques pénicillino-résistants.

Dès ses premiers travaux, Fleming a rapporté l'existence exceptionnelle de souches de staphylocoques « presque insensibles à la pénicilline ». Ceci a été depuis confirmé par de nombreux auteurs. La notion de souches de *staphylocoques naturellement pénicillino-résistants* paraît donc solidement établie.

Il est facile au laboratoire de conférer à une souche, primitivement sensible, une *résistance acquise in vitro* par repiquages successifs dans un milieu contenant des concentrations croissantes de l'antibiotique. Mais il semble, d'après les travaux de Mac Kee et Houck [73], que cette résistance acquise s'accompagne d'une perte de la virulence et de modifications importantes des caractères bactériologiques : la croissance est plus lente, la morphologie atypique, mais les réactions biochimiques inchangées.

Par contre, ces souches devenues hautement pénicillino-résistantes *in vitro*, gardent la même sensibilité que le témoin en face des sulfamides ou des autres antibiotiques. Spink et ses collaborateurs ont montré qu'elles deviennent plus sensibles à l'action bactéricide du sang, donc vraisemblablement, aux autres mécanismes de défense de l'organisme.

La possibilité du développement d'une *pénicillino-résistance acquise in vivo* a été constatée par de nombreux auteurs.

Cependant Dowling [38], Rammelkamp et Maxon [85] ont rapporté des observations cliniques avec contrôles bactériologiques absolument irréfutables.

D'autre part, les études statistiques de Mary Barber [2] et de nombreux autres auteurs soulignent l'augmentation de fréquence en clinique humaine des souches de staphylocoques pénicillino-résistants. On peut se demander s'il s'agit là d'une pénicillino-résistance acquise *in vivo* réalisant un mutant résistant à partir d'une souche sensible ou d'une sélection de souche naturellement résistante dont la multiplication est favorisée par la disparition des souches sensibles.

Quel que soit le mécanisme intime de cette transformation, la notion de la fréquence croissante de ces souches résistantes conduit à souligner l'intérêt de rechercher systématiquement, à côté des caractères pathogènes, la sensibilité d'un staphylocoque donné à la pénicilline. La sensibilité à cet antibiotique étant indépendante de sa susceptibilité à la streptomycine, il y a intérêt à pratiquer systématiquement les deux tests.

II. LA STREPTOMYCINE

La découverte d'un nouvel agent antibactérien, faite en 1944 par Waksman, Schatz et Bugie, a été exprimée sous ce titre: « La streptomycine, une substance douée d'un pouvoir antibiotique vis-à-vis de bactéries Gram-positives et Gram-négatives. » En fait, la streptomycine a dû son rapide essor en thérapeutique à son action très remarquable vis-à-vis de certaines bactéries intestinales et du bacille de Koch. Elle est encore dans ce domaine bien souvent irremplaçable. Mais depuis le mémoire original de Waksman le champ d'action de la streptomycine s'est encore élargi et l'action antibactérienne de cet antibiotique sur des espèces habituellement pénicillino-sensibles, comme les staphylocoques, présente aujourd'hui un grand intérêt pratique.

1° Détermination de la sensibilité a la streptomycine des staphylocoques.

Le principe de la méthode et les techniques employées sont comparables à celles proposées pour la pénicilline :

— Méthode de diffusion en gélose,

— Méthodes de dilutions en série.

En effet, bien que le mécanisme intime de l'action antibiotique soit vraisemblablement différent, la streptomycine comme la pénicilline exerce sur les staphylocoques un pouvoir bactéricide ou bactériostatique suivant les concentrations.

Les résultats indiqués par les auteurs varient dans de très larges limites : 0,5 à 128 unités-cm^3, d'après Murray, Paine et Finland. En moyenne, la majorité des souches de staphylocoques sont sensibles à des concentrations de l'ordre de 3 à 4 u./cm^3.

2° Les staphylocoques streptomycino-résistants :

On voit donc qu'il existe des souches naturellement résistantes à l'antibiotique, mais si la pénicillino-résistance acquise est un phénomène généralement transitoire, avec la streptomycine la résistance est fréquente, intense, précoce et, en général, permanente.

La résistance acquise à la streptomycine est facile à réaliser *in vitro*, en repiquant le germe dans des milieux contenant une concentration sub-léthale de l'antibiotique. *In vivo*, cela a été démontré expérimentalement par passages en série sur des animaux inoculés. Sa possibilité chez le malade porteur d'une staphylococcie et soumis à la streptomycinothérapie a été démontrée par de nombreux auteurs.

La résistance à la streptomycine paraît être une propriété autonome, indépendante du pouvoir pathogène; en ceci déjà, l'action de la streptomycine diffère de la pénicilline.

L'indépendance de la résistance à la streptomycine par raport à la sensibilité à d'autres agents antibactériens — sulfamides, pénicilline — a été établie à plusieurs reprises. La streptomycino-résistance acquise par une souche de staphylocoques est un caractère permanent. Elle existe malgré des repiquages sur milieux privés d'antibiotiques ou après inoculations en série à l'animal. Cette résistance peut s'accompagner d'altérations morphologiques et métaboliques; son mécanisme, encore mal connu, pose des problèmes analogues à ceux que posent la pénicillino-résistance.

L'étude de la sensibilité à la pénicilline et à la streptomycine présente donc pour les staphylocoques un très grand intérêt. Il importe de se rapeler qu'il s'agit toujours d'une propriété de la souche et non de l'espèce.

Il existe des souches *naturellement* pénicillino-résistantes et des souches naturellement streptomycino-résistantes. Ce sont là des caractères absolument indépendants qui se rencontrent très rarement sur la même souche.

La résistance *acquise* aux antibiotiques est un problème particulièrement important, mais il se pose de façon tout à fait différente pour la pénicilline et la streptomycine.

La pénicillino-résistance, relativement facile à réaliser *in vitro*, s'accompagne d'une modification des caractères morphologiques, biochimiques du germe et en général d'une perte du pouvoir pathogène [34] [43] [65]. C'est un caractère transitoire qui disparaît après repiquages répétés ou inoculations en série à l'animal. L'existence d'une pénicillino-résistance acquise *in vivo* est une éventualité possible, mais très rarement réalisée en clinique.

Par contre, *la streptomycino-résistance* acquise est un phénomène très fréquent, souvent précoce, toujours intense. Même lorsqu'elle s'accompagne de modifications des caractères bactériologiques, elle apparaît comme un caractère permanent, transmissible héréditairement. Elle est indépendante du pouvoir pathogène. Comme pour la pénicilline son mécanisme est encore mal connu, on possède seulement une idée de ses circonstances d'apparition.

Quoi qu'il en soit, la notion de l'indépendance de la résistance d'une souche à la pénicilline, par rapport à la sensibilité à d'autres agents antibactériens et en particulier à la streptomycine, nous amène à considérer que les résultats des tests de sensibilité à ces deux antibiotiques doivent constituer aujourd'hui, deux caractères importants dans l'étude bactériologique d'une souche de staphylocoques au même titre que les caractères morphologiques ou les propriétés biochimiques.

DEUXIÈME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

Le plan général de notre travail a été le suivant :

Nous avons systématiquement recherché, chez 231 femmes, les staphylocoques pathogènes dans le vagin.

Sur 72 d'entre elles, les prélèvements suivants ont, en outre, été effectués :

— Au niveau du rhino-pharynx, dans le but de rechercher les staphylocoques pathogènes.

— Au niveau du vagin, dans le but d'étudier les perturbations possibles des caractères biologiques.

Enfin, nous avons dépisté les staphylocoques pathogènes dans le rhino-pharynx du personnel hospitalier des deux services obstétricaux. Cette recherche a groupé 29 personnes.

L'ensemble de ce travail a nécessité : 544 prélèvements, dont :

408 vaginaux;

136 rhino-pharyngés.

Nous exposerons nos travaux personnels en trois chapitres :

I. TECHNIQUES EMPLOYÉES.

II. RÉSULTATS.

III. TENTATIVES D'INTERPRÉTATION.

CHAPITRE PREMIER

TECHNIQUES EMPLOYÉES

Nous suivrons, dans ce chapitre, les temps successifs de notre travail :

A. — Techniques des prélèvements.
B. — Cultures.
C. — Détermination des caractères pathogènes des souches.
D. — Sensibilité aux antibiotiques.

A. TECHNIQUES DES PRÉLÈVEMENTS

1° Dans le vagin :

En moyenne, nous avons pratiqué deux prélèvements chez les femmes :

— *Le premier, avant l'accouchement,* toutes les fois que cela a été possible, dès l'admission.

Le second, après l'accouchement; la plupart ont été faits le dixième jour.

Dans certains cas d'urgence, nous n'avons pas pu pratiquer le premier prélèvement.

Tous ces prélèvements ont été faits après mise en place d'un spéculum stérile.

Nous avons observé les précautions suivantes :

a) Dans le but d'éviter une contamination externe, le spéculum ne recevait pas de corps gras pour faciliter sa mise en place.

b) Pour éviter de contaminer la partie profonde du vagin, le spéculum était progressivement ouvert après passage de la vulve. Ainsi, deux zones, situées sur les parois latérales n'avaient pas été touchées.

Le spéculum mis en place, les prélèvements suivants ont été effectués, au 1/3 moyen du vagin, sur la paroi latérale, en évitant de toucher le col :

a) **A l'aide d'un fil de platine,** porté au rouge entre chaque prélèvement :

1. *Pour la recherche des staphylocoques pathogènes:* ensemencement immédiat dans le bouillon hypersalé de CHAPMAN (milieu d'enrichissement).

2. *Pour la recherche de l'acidité :* lorsque la quantité de sécrétions le permettait.

3. *Pour la détermination du type de flore:* étalement sur lame.

4. *Pour l'étude des frottis vaginaux;* étalement sur lame et fixation immédiate.

b) **A l'aide d'un écouvillon de coton stérile :**

Pour la recherche du glycogène; étalement par déroulement sur une lame.

Ces prélèvements accompagnaient l'étude de l'observation clinique de la malade et plus particulièrement la recherche des antécédents staphylococciques possibles.

2° DANS LE RHINO-PHARYNX :

Les prélèvements sont habituellement faits par tous les auteurs au niveau des fosses nasales antérieures. Nous avons préféré faire un écouvillonage du rhino-pharynx très localisé à la face postérieure du voile du palais, en évitant de toucher la langue et les amygdales au passage.

Les prélèvements ont été faits de la façon habituelle avec un écouvillon de coton stérile, légèrement coudé et contenu dans un tube de verre.

L'ensemencement en bouillon hypersalé de CHAPMAN était fait au laboratoire dans l'heure suivante.

B. CULTURES

Nous avons choisi, pour l'isolement, le diagnostic et la conservation de nos souches les milieux de CHAPMAN pour leur simplicité, la régularité de leurs résultats et la simplicité des réponses.

1° Milieux d'isolement :

Comme nous venons de le dire, les prélèvements vaginaux et rhino-pharyngés étaient ensemencés sur *le milieu liquide de* Chapman ou *milieu d'enrichissement.*

Nous avons, en effet, choisi un milieu d'enrichissement en cas de produits pathologiques pauvres en staphylocoques et pour inhiber le plus possible les autres germes.

Le milieu était le suivant :

Nutrient broth (Difco)	8 gr.
Lactose	7 gr. 5
Proteose peptone (Difco)	9 gr.
Gélose en poudre	1 gr.
Eau distillée	1.000 cm^3

réparti en tube à raison de 10 cm^3.

Après ensemencement du produit vaginal ou rhino-pharyngé, les tubes étaient portés à l'étuve à 37° pendant 24 heures, au lieu de 36 heures pour éviter une pousse trop abondante dans certains cas.

2° Milieux de diagnostic :

Nous avons utilisé comme milieu de diagnostic la gélose mannitée hypersalée au rouge de phénol de Chapman, préalablement coulée en boite de Petri (voir composition page 49).

Nous avons porté la quantité de gélose à 25 gr., en raison des difficultés de manipulation d'un milieu trop mou.

Une goutte de la culture de 24 heures, en milieu d'enrichissement est étalée, à la surfacee de la gélose. Les boîtes sont mises à l'étuve à 37° pendant 24 heures.

Au bout de ce laps de temps, trois cas peuvent se présenter :

1° Le milieu a conservé un ton rougeâtre : rien n'a poussé;

2° Le milieu a viré au carmin de place en place : de petites colonies roses, auréolées de rouge sont visibles : *mannitol non fermenté;*

3° Le milieu a viré au jaune : sur ce fond se détachent de grosses colonies jaunes : *mannitol fermenté.*

Dans ces deux derniers cas, on peut soupçonner la présence

de staphylocoques, mais seuls les examens ultérieurs pourront l'affirmer.

Avant de suivre l'exposé de ces techniques, nous voudrions indiquer certaines constatations concernant la gélose mannitée au rouge de phénol, qui nous ont paru intéressantes :

— Il y a intérêt à couler le milieu la veille et à le conserver à l'étuve à 37° pour que sa surface soit parfaitement sèche.

— Mais en prenant la précaution de laisser refroidir les boîtes une heure environ, avant de les ensemencer. En effet, à la sortie de l'étuve, le milieu est mou.

— Pour cette raison, l'ensemencement au fil de platine risque d'être difficile. Comme Chapman le recommande, nous nous sommes servis, pour l'étalement de l'extrémité d'une pipette Pasteur fermée [28].

— Une surveillance du milieu pendant l'incubation est nécessaire. En effet, la zone d'acidité (jaune) partie des colonies mannitol-positives, risque, en diffusant, d'englober des colonies mannitol-négatives. Il y a donc lieu de marquer sur le fond de la boîte les souches M+ et M—, dès qu'elles sont décelables.

Sur 239 souches isolées, l'erreur s'est produite sept fois dans un sens ou dans l'autre (2,9 %).

— Enfin, la sélectivité du milieu de Chapman ne s'exerce pas contre les diphtérimorphes.

Sur 244 souches isolées, nous avons facilement reconnu cinq fois, après coloration de Gram sur les colonies, *Corynebacterium cutis commune*.

— Par contre, la coloration de Gram ne permet pas toujours de différencier les entérocoques des staphylocoques.

Dans ce cas, *l'épreuve de la catalase* nous a paru être un moyen rapide et sûr de différencier les deux germes.

Cette épreuve, décrite en 1923 par Mac Leod et Gordon, est basée sur le fait que tous les *Staphylococcæ* et les *Micrococcæ* produisent une catalase qui libère l'oxygène de l'eau oxygénée par phénomène enzymatique.

Les entérocoques et les streptocoques ne possèdent pas cette propriété.

Technique (Issaacs et Scouller) [63] :

A quelques centimètres cubes d'une culture en bouillon ou en eau peptonée, on ajoute 1 à 2 cm^3 d'une solution d'eau oxygénée à 10 volumes :

— *S'il y a dégagement gazeux,* le germe est soit un staphylocoque, soit un microcoque;

— *S'il n'y a pas dégagement gazeux,* le germe est un streptocoque ou un entérocoque.

On peut émulsionner une colonie, prélevée sur milieu solide, directement dans l'eau oxygénée : soit dans un tube, soit sur une lame.

Il faut s'assurer auparavant que le fil de platine ou le milieu de culture ne décompose pas spontanément l'eau oxygénée.

L'épreuve de la catalase ne saurait à elle seule remplacer un examen microscopique dans le cas particulier du diagnostic des germes isolés du milieu de Chapman. En effet, les staphylocoques ne sont pas les seuls germes à la donner : parmi les diphtérimorphes que l'on peut trouver incidemment sur le milieu de Chapman, *Corynebacterium cutis commune* et le bacille d'Hoffman sont *catalase-positifs.*

Dans le cas où l'épreuve de la catalase nous a paru douteuse, nous avons ensemencé la colonie sur gélose à l'esculine. Aucune fois, nous n'avons constaté la présence d'entérocoques, preuve de la parfaite sélectivité du milieu de Chapman.

De plus à la suite des travaux de certains auteurs, qui conseillent l'emploi d'un milieu plus sélectif, à la concentration de 100 gr. de chlorure de sodium par litre, nous avons étudié en parallèle les deux milieux et nous avons pu constater que, une fois sur dix, le milieu à 100 gr./litre inhibait les staphylocoques qui poussaient sur le milieu à 75 gr./litre.

D'autre part, des ensemencements de milieu de Chapman à 75 gr./litre avec des suspensions polymicrobiennes (staphylocoques, streptocoques, colibacilles) ne nous ont donné, après incubation de 24 heures, que des cultures pures de staphylocoques.

3° Milieux de conservation :

Nous avons utilisé, pour la conservation des souches, le milieu de Chapman hypersalé (voir composition p. 51).

L'étude parallèle de la conservation de nos 50 premières souches sur le milieu de Chapman et sur gélose ordinaire nous a fait abandonner la gélose ordinaire, sur laquelle se conservent moins bien les caractères des staphylocoques pathogènes, avec risque de souillures beaucoup plus important.

C. DÉTERMINATION DES CARACTÈRES PATHOGÈNES DES SOUCHES

Sur les 239 souches isolées, nous avons fait les épreuves suivantes :

1. — Liquéfaction de la gélatine;
2. — Fermentation du mannitol;
3. — Epreuve de la coagulase;
4. — Recherche des hémolysines;
5. — Recherche de la fibrinolysine;
6. — Recherche de l'entérotoxine;
7. — Détermination du pigment.

1° Liquéfaction de la gélatine.

Les auteurs classiques s'accordent pour dire que la liquéfaction de la gélatine est le meilleur test pour séparer les *Staphylococceæ* des *Micrococceæ*. Aussi, avons-nous pratiqué cette épreuve sur toutes les souches isolées.

L'ensemencement a été fait par piqûre centrale d'un culot de gélatine ordinaire. Les tubes, capuchonnés, ont été laissés à la température du laboratoire (comprise entre 12° et 18°).

Des lectures ont été faites tous les deux jours, pendant vingt jours. Nous avons considéré comme ne liquéfiant pas la gélatine

toute souche n'ayant pas entrainé la formation d'un entonnoir de la taille d'une demi-noisette, au vingtième jour.

Sur 239 souches, 182 sont liquéfiantes, 57 ne le sont pas.

2° Fermentation du mannitol.

Toutes les souches ont été étudiées sur le milieu de diagnostic de Chapman, à l'isolement.

Cependant, après une conservation plus ou moins prolongée au laboratoire, nous avons voulu contrôler la fixité de la fermentation ou de la non-fermentation du mannitol en repiquant les souches sur ce même milieu (à raison de 9 par boîte).

Cette deuxième épreuve nous a permis de corriger certaines de nos interprétations qui avaient été douteuses à l'isolement en raison du chevauchement des zones de virage.

A l'isolement, 112 mannitol-positives, 120 mannitol-négatives, 7 douteuses.

Après conservation, 117 mannitol-positives, 122 mannitol-négatives, aucune douteuse.

Nous avons donc retenu les résultats donnés par les staphylocoques après leur conservation, parce que l'épreuve est alors plus lisible. Il est facile de faire des ensemencements punctiformes suffisamment espacés, évitant le chevauchement des zones de fermentation.

3° Epreuve de la coagulase.

Les facteurs de la coagulation du plasma par les staphylocoques, en milieu liquide, ont été étudiés avec une très grande rigueur par Richou [87]. Nous avons essayé de nous en rapprocher le plus possible, en recherchant une méthode assez rigoureuse, mais de mise en œuvre facile.

Nous allons donc passer rapidement ces facteurs en revue, en indiquant pour chacun d'eux les raisons de notre choix.

a) **Origine du plasma :** Les recherches faites ont montré que le plasma de lapin donne les meilleurs résultats. Il est, d'autre part, facile à obtenir par ponction intracardiaque.

Nous l'avons adopté, mais nous avons cherché à étudier, parallèlement, la valeur du plasma humain desséché.

Dans une série préliminaire, nous avons donc étudié l'action

de 91 souches, à la fois sur le plasma frais de lapin et sur du plasma humain desséché, provenant des stocks du Service de Santé de l'Armée Américaine. Celui-ci nous a donné les mêmes résultats que le plasma de lapin, mais, bien souvent, après la vingt-quatrième heure. Aussi l'avons-nous abandonné, en raison de la lenteur des réponses.

b) **Anticoagulant :** Nous avons employé l'oxalate de potassium à la concentration de 2 ‰. Mais, pour éviter la formation d'une hémolyse légère dans le prélèvement, nous avons un peu modifié la mise en contact du sang et de l'anti-coagulant.

En effet, la manipulation habituelle est la suivante : le sang, recueilli par ponction intra-cardiaque, est versé dans un tube à centrifuger, contenant l'oxalate de potassium stérile et desséché (0,5 cm³ d'une solution à 4 % versée aseptiquement et portée à l'étuve à 100°). Le mélange se fait par agitation. Le plasma est séparé des globules par centrigugation. Invariablement, par ce procédé le plasma recueilli est teinté.

Pour éviter une cause d'erreur, nous aspirons dans une seringue 0,5 cm³ d'une solution stérile d'oxalate de potassium à 4 %, contenue en ampoules. Puis, avec la même seringue, nous pratiquons la ponction intra-cardiaque. Le mélange sang-anticoagulant se fait avec un minimum de traumatisme pour les globules.

La concentration finale se trouve être sensiblement de 2 ‰. L'erreur relative est faible et nous n'avons jamais observé d'hémolyse ou de modifications dans la coagulation des plama recueillis de cette façon.

c) **La dilution du plasma :** Nous avons choisi la dilution en eau physiologique au 1/5 (Chapman).

d) **Le volume du plasma :** Nous avons recherché un volume de plasma qui permette de bien observer le phénomène et qui soit facilement mesurable.

Le volume de 0,5 cm³ nous a paru remplir ces conditions.

e) **L'ensemencement :** Le volume des germes devant être fixe, comme les autres facteurs, nous avons éliminé la méthode d'ensemencement à l'anse chargée à partir d'un milieu solide.

Nous avons adopté l'ensemencement à partir d'une culture en

bouillon de la souche à étudier, après incubation à 37° pendant 24 heures. Ainsi, la turbidité du milieu sera sensiblement la même et ne variera que dans de faibles limites pour une série de souches à tester.

Nous avons choisi le volume de l'inoculum égal au volume du plasma, pour faciliter les manipulations et mettre les deux éléments réactifs en quantités égales.

La méthode employée a été la suivante :

Dans un tube à hémolyse, on verse à la pipette 0,5 cm^3 de plasma frais de lapin, dilué au 1/5 en eau physiologique. On y ajoute 0,5 cm^3 d'une culture de 24 heures, en bouillon simple, de la souche à tester.

Pour chaque épreuve, nous faisions trois témoins :

— *Le premier :* contenant du plasma seul, était destiné à éliminer l'erreur due à la coagulation spontanée du plasma;

— *Le deuxième :* contenant du plasma et du bouillon non ensemencé, était destiné à éliminer l'erreur due à la coagulation du plasma par le bouillon.

En effet, tous les bouillons ordinaires sont impropres à cette épreuve, car ils provoquent la coagulation du plasma en moins de 24 heures. Cette propriété, qui leur est donnée par la peptone entrant dans leur formule de fabrication, se retrouve dans le fait que l'eau peptonée normale de laboratoire coagule, elle aussi, de façon massive, le plasma en moins d'une heure.

Par contre, la simple infusion de viande sans peptone ne provoque pas cette coagulation en 24 heures et permet une pousse abondante des staphylocoques.

— *Le troisième témoin :* contenant du plasma et une culture en bouillon d'un germe coagulase-positif, était destiné à contrôler la faculté de coagulation du plasma.

Tous les tubes étaient portés à l'étuve à 37°. Des lectures étaient faites :

— De demi-heure en demi-heure : dans les trois premières heures.

— D'heure en heure : dans les cinq heures suivantes.
— A la vingt-quatrième heure.

L'apparition d'un caillot, même peu volumineux était considéré comme un signe de positivité.

Sur 239 souches, nous avons enregistré les résultats bruts suivants :

Souches coagulase-positives : 75.
Souches coagulase-négatives : 164.

Parmi ces souches non coagulantes figurent toutes celles qui ne liquéfient pas la gélatine.

4° Recherche des hémolysines.

Nous avons recherché la production d'hémolysines par la méthode qualitative sur milieu solide.

Nous reconnaissons que cette méthode est moins précise que celle en milieu liquide, mais qu'elle donne néanmoins une appréciation suffisante de l'activité hémolytique d'une souche. Elle permet, d'autre part, d'expérimenter plus rapidement sur un grand nombre de souches.

Nous nous sommes servis de sang de lapin pour la recherche de l'hémolysine α et de sang de mouton pour la recherche des hémolysines β et $\alpha\beta$.

a) **Recherche de l'hémolysine** α : Les globules de lapin, après séparation du plasma pour la coagulase, sont repris par un égal volume d'eau physiologique et conservés en glacière.

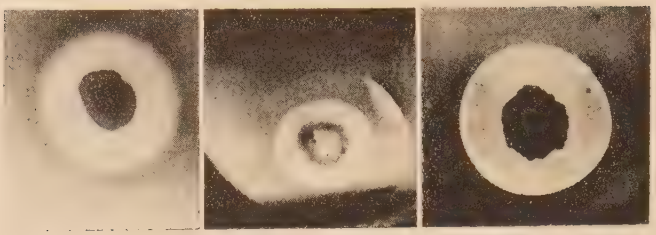
Deux centimètres cubes de cette suspension sont mélangés à 10 cm^3 de gélose fondue et ramenée à 50° au bain-marie (Williams et Harper) [98]. Le mélange est coulé en boîte de Pétri.

Les souches sont ensemencées à raison de 9 par boîte. Jamais les zones d'hémolyse n'ont chevauché par cette méthode d'ensemencement.

L'incubation se fait à l'étuve à 37°, pendant 24 heures.

Ont été considérées comme α-hémolytiques les souches donnant en 24 heures une zone claire, non transparente, à bords flous, centrée par la colonie.

b) **Recherche des hémolysines β et $\alpha\beta$:**



A B C

FIGURE 1.

Souches hémolytiques sur gélose au sang de mouton.

A. Colonie α Hémolytique (après hot cold lysis).

B. Colonie β Hémolytique (après 8 heures d'incubation et un temps très court de réfrigération, pour mettre en évidence la zone qui s'éclaircira après passage en glacière. Le bord externe de cette zone est nettement visible comme une lentille biconvexe à 2 heures et très faiblement à 4 heures).

C. Colonies α β Hémolytique (après hot cold lysis).

(Clichés pris par M. le Dr J. QUERCY.)

Le sang de mouton a été prélevé chez cet animal par ponction de la veine jugulaire profonde.

Le sang, recueilli stérilement avec la même technique que celle employée dans les centres de transfusion, a été défibriné à l'aide de perles de verre.

Les géloses au sang ont été préparées en ajoutant 2/10 de sang défibriné à la gélose fondue et ramenée à 50°. Le mélange est réparti en boîte de Pétri.

Les boîtes, après ensemencement, sont portées à l'étuve à 37°, pendant 8 heures (BRYCE et ROUNTREE), [8] puis à la glacière, pendant une nuit (« hot cold lysis ») (BIGER, BOLAND et O'MEARA) [4].

Dans ce cas (fig. 1) :

1° Une zone d'hémolyse claire, à bords flous, qui n'augmente pas après passage en glacière, témoigne de la présence d'une *hémolysine α*.

2° Une zone d'hémolyse transparente, à bords nets, comme taillés à l'emporte-pièce, qui augmente après passage en glacière, témoigne de la présence d'une *hémolysine* β.

3° Une zone d'hémolyse, constituée d'une succession d'anneaux concentriques alternativement clairs et flous, témoigne de la présence d'une *hémolysine* $\alpha\beta$.

Sur 239 souches :

147 hémolysent le sang de lapin;

98 hémolysent le sang de mouton, dont :

6 β - hémolytiques,

1 $\alpha\beta$ -hémolytique.

91 α - hémolytiques,

5° Recherche de la fibrinolysine.

Les mêmes remarques qui nous ont fait choisir la méthode de recherche des hémolysines en milieu solide peuvent s'appliquer à la recherche de la fibrinolysine.

Nous avons donc suivi la méthode de Christie et Wilson :

La solution de fibrine s'obtient en soumettant du plasma, oxalaté à 2 ‰, au bain-marie à 56° pendant 10 minutes. La fibrine précipite. On la sépare du liquide surnageant par centrifugation à 6.000 tours-minute Il y a intérêt à opérer dans le tube même à centrifuger pour éviter des pertes du produit et des souillures toujours possibles. Le culot de fibrine est repris par une quantité d'eau physiologique égale à celle du plasma primitif.

On verse 1 cm³ de cette suspension dans 10 cm³ de gélose fondue et ramenée à 50°. L'épaisseur du mélange, coulé en boîte de Pétri, ne doit pas excéder 5 mm. Le milieu est légèrement opaque, parsemé de fins grumeaux de fibrine.

Les souches, distribuées par ensemencement punctiforme à raison de 9. par boîte, sont mises à l'étuve à 37°, pendant 24 heures.

La lecture est simple et normalement se fait à l'œil nu : les souches fibrinolytiques s'entourent d'une auréole transparente, à l'intérieur de laquelle tous les grains de fibrine ont disparu. Le diamètre est fonction de l'activité de la souche, mais il est sensiblement de l'ordre de grandeur d'une zone d'hémolyse.

Dans certains cas où nous avons employé une gélose très

claire, à peine teintée, le volume de la solution de fibrine a été porté à 2 cm³, pour augmenter l'opacité du milieu.

Les résultats bruts suivants ont été enregistrés :
Sur 236 souches testées :
— 62 sont fibrinolytiques;
— 174 ne possédaient pas cette propriété.

Dans ce groupe, entraient toutes les souches qui ne liquéfiaient pas la gélatine.

6° Recherche de l'entérotoxine.

Toutes nos souches ont été testées en vue de la recherche de l'entérotoxine sur le milieu n° 110 de Chapman [25].

Nous rappelons sa formule :

Eau distillée	1.000 cm³
d-mannitol	10 gr.
Bacto-tryptone (Difco)	10 gr.
Chlorure de sodium	75 gr.
Bacto-lactose	2 gr.
Bacto-yeast extract	2 gr. 5
Phosphate dipotassique anhydre	5 gr.
Bacto-gélatine	30 gr.

« *Bacto-yeast extract* » est un extrait de levure (Difco). N'en ayant pas dans le stock de milieux américains appartenant au Laboratoire, nous l'avons remplacé par :

Levure de bière fraîche : 5 cm³.

Les souches ont été repiquées en ensemencement punctiforme, à raison de 9 par boîte et mises à l'étuve à 30° pendant 48 heures exactement (Chapman) [25] [27].

A ce moment, la surface du milieu est recouverte avec 5 cm³ d'une solution saturée de sulfate d'ammonium. Au bout de 5 minutes, le milieu devient mat et très opaque, seules persistent des zones transparentes autour des colonies produisant une entérotoxine.

Le diamètre de cette zone transparente est variable, mais la circonférence extérieure est très nette.

Les résultats bruts suivants ont été enregistrés :

Sur 229 souches testées :
— 83 sont entérotoxiques.
— 146 ne donnent rien.

Pour nous rendre compte du pouvoir entérotoxique de telles souches, nous avons terminé notre étude par quelques injections à de jeunes chats (« kitten test »).

En raison de la pénurie d'animaux réactifs, nous avons limité cette étude à quatre souches, choisies pour leurs caractères bactériologiques différents. Elles ont été, au préalable, cultivées sur le milieu de Dolman [11] [35] [36], de formule suivante :

Eau distillée	1.000 cm³
Proteose peptone (Difco)	20 gr.
Chlorure de sodium	5 gr.
Phosphate dipotassique	1 gr.
Phosphate monopotassique	1 gr.
Sulfate de magnésium	0 gr. 2
Chlorure de calcium	0 gr. 1
Gélose en poudre	3 gr.

Ajuster à pH 7,4.

Porter à l'ébullition. Ramener à 1 l. Stériliser à l'autoclave à 120° pendant 30 minutes. Couler en boîtes de Petri à raison de 0,5 à 1 cm d'épaisseur.

Les souches à tester sont ensemencées sur trois boîtes et mises à incuber à 37°, pendant 40 heures, en atmosphère de 30 % de CO^2.

A la sortie de l'étuve, le contenu des boîtes est filtré sur papier-filtre sous pression (filtre Seitz), puis sur bougie Chamberland L3.

Le filtrat est mis en ampoules scellées et chauffées au bain-marie à 100° pendant 30 minutes. L'entérotoxine est thermostable et les autres toxines staphylococciques sont détruites.

L'entérotoxine conserve toutes ses propriétés en glacière.

Kitten test : On prend un jeune chat et on lui injecte dans le péritoine 1 cm³ de filtrat par kilogramme de poids. Si le staphylocoque est entérotoxique, on voit survenir, au bout d'une

demi-heure des nausées puis, au bout d'une heure, des vomissements et une diarrhée importante. L'animal est abattu, chancelant pendant deux à trois heures. Il se remet facilement ensuite. L'injection aux quantités correspondantes à celles signalées ci-dessus d'un filtrat de milieu de Dolman non ensemencé ou ensemencé avec un staphylocoque non entérotoxique ne produit l'apparition d'aucun trouble.

Nous résumons ci-dessous les caractères des souches testées et les résultats observés :

Souche n° 8 :

Entérotoxine (milieu de Chapman)	0
Pigment	blanc
Mannitol	+
Gélatine	+
Coagulase	0
Hémolysine	0
Fibrinolysine	0
Pénicillino-sensibilité	0,016 u.o./cm^3

Injectée à une jeune chatte de 2.200 grammes à raison de 2,2 cm^3 par voie intra-péritonéale.

Aucun signe digestif dans les heures suivantes. Comportement absolument normal.

Souche n° 237 :

Entérotoxine (milieu de Chapman)	0
Pigment	doré
Mannitol	+
Gélatine	+
Coagulase	+
Hémolysine (sang de lapin)	α
Hémolysine (sang de mouton)	α
Fibrinolysine	+
Pénicillino-sensibilité	160 u.o./cm^3

Injectée à une jeune chatte de 2.325 grammes à raison de 2,4 cm^3 par voie intrapéritonéale.

Une heure après l'injection : abattement, anorexie, pas de diarrhée.

Douze heures après, l'animal était complètement rétabli.

Sept jour après, sur les mêmes animaux, nous avons renouvelé l'expérience avec deux souches différentes.

Souche n° 105 :

Entérotoxine (milieu de Chapman)	+
Pigment	blanc
Mannitol	0
Gélatine	+
Coagulase	0
Hémolysine	0
Fibrinolysine	0
Pénicillino-sensibilité	0,008 u.o./cm³

Injectée à une jeune chatte de 2.400 grammes à raison de 2,5 cm³ par voie intra-péritonéale.

Dans les heures suivantes, l'animal se comporte normalement. Dans la nuit, émission de quelques selles diarrhéiques.

Souche n° 210 :

Hémolysine	α
Entérotoxine (milieu de Chapman)	+
Pigment	doré
Mannitol	+
Gélatine	+
Coagulase	+
Hémolysine	α
Fibrinolysine	+
Pénicillino-sensibilité	0,045 u.o./cm³

Injectée à une jeune chatte de 2.250 grammes à raison de 2,3 cm³ par voie intra-péritonéale.

Une heure après l'injection, l'animal est roulé en boule, poils hérissés, larmoyant. La présentation de morceaux de viande déclenche aussitôt des nausées violentes et répétées.

Deux heures après l'injection, diarrhée qui dure 24 heures.

Après la vingt-quatrième heure, tous les signes sont en régression et, après la trente-sixième heure, le comportement de l'animal est normal.

7° Détermination du pigment.

La pigmentation des souches a été étudiée sur différents milieux, dans le but de rechercher celui qui pourrait nous apporter les résultats les moins discutables et les plus faciles à lire.

La gélose ordinaire :

Elle ne permet de différencier que les pigmentations extrêmement accusées : nettement blanches ou nettement dorées.

Le sérum coagulé :

La pigmentation apparaît plus nettement que sur la gélose ordinaire, ne serait-ce qu'à cause de la couleur blanche du milieu. Les staphylocoques poussent bien, mais il est encore difficile de distinguer sur le sérum coagulé les souches à pigmentation faible des non pigmentées.

Le milieu au chlorure de sodium de Chapman (milieu de conservation) :

Sur ce milieu, réparti en tubes et incliné, les staphylocoques poussent bien et la pigmentation est lisible après 24 heures d'incubation à 37° et, de façon définitive, au bout de 10 jours de culture supplémentaire à la température du laboratoire.

Nous avons pu constater que la pigmentation se maintenait inchangée après des séjours variables en glacière et la lecture de la pigmentation peut être faite très tardivement pour des souches conservées. Les pigmentations observées sont éclatantes et très faciles à différencier. On reconnaît aisément les staphylocoques : *orangé, doré, citrin, crème, blanc.*

Nous avons obtenus les résultats bruts suivants :

- Orangé : 36.
- Doré : 20.
- Blanc : 169.
- Crème : 14.

Mais les auteurs s'accordent à ne différencier que deux variétés : S. doré et S. blanc.

Dans la suite de notre exposé, nos résultats seront donc donnés ainsi :

— Dorés : 56.

— Blancs : 183.

Le milieu au crystal-violet (Chapman) [14].

Nous rappelons la formule de Chapman :

Beef extract	3 gr.
Proteose peptone (Difco)	5 gr.
Lactose	10 gr.
Gélose en poudre	15 gr.
Crystal-violet	0 gr. 0033
Eau distillée	1.000 cm^3

Nous avons employé cette formule et une autre dans laquelle « Beef extract » et « Proteose peptone » sont remplacés par du bouillon ordinaire dans la proportion de 1.000 cm^3.

L'ensemencement de ces deux milieux en parallèle nous a donné des résultats comparables, bien que sur le milieu original de Chapman, les colonies soient plus grosses et se chargent un peu plus abondamment en violet.

La lecture est facile :

— *Colonies dorées :* auréole violette périphérique;

— *Colonies blanches pathogènes :* entièrement violettes;

Colonies blanches non pathogènes : incolores.

D. SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES

L'espèce bactérienne *Staphylococcus pyogenes* est habituellement sensible à la pénicilline. En réalité, nous avons vu qu'il existe des variations importantes suivant les souches dans la sensibilité à cet antibiotique. Aussi, de même que nous avons recherché les caractères biochimiques et pathogènes, nous

avons systématiquement testé les souches, que nous avons isolées, en présence de la pénicilline, puisque c'est l'agent antibactérien le plus couramment utilisé contre les staphylocoques pathogènes. Etant donné l'indépendance entre la sensibilité d'une souche à la pénicilline et sa susceptibilité à l'égard de la streptomycine, nous avons testé seulement, en présence de la streptomycine, les souches qui se sont montrées relativement insensibles à la pénicilline.

Nous avions le choix pour ces déterminations entre les méthodes de diffusion en gélose et les méthodes de dilutions. Nous avons préféré ces dernières, car elles nous ont paru plus faciles à utiliser de façon systématique sur un nombre de souches assez important.

La technique employée dérive de celle proposée par SUREAU [90]. Modifiée et simplifiée par G. ANDRIEU, Mme ENJALBERT et J. MONNIER [1], elle est couramment utilisée au Laboratoire de Bactériologie de la Faculté.

Nous en rappelons brièvement le principe et la technique :

— **Principe :** C'est un test de dilutions en série : On étudie la croissance du germe en milieu liquide, en présence de concentrations antibiotiques décroissantes. La pousse est appréciée par la fermentation d'un glucide et le virage d'un indicateur coloré.

— **Technique :**

Le germe : culture de 24 heures en bouillon ordinaire.

Le milieu :

Glucose à 30 %	1 cm³
Phénol-sulfone phtaléine à 2 ‰	0,5
Eau peptonée (pH 8,2)	8,5

Solutions antibiobiques : dilutions en eau physiologique de :

Pénicilline (*) à 1, 10, 100, 1.000 unités Oxford/cm³.

(*) Nous tenons à remercier les Laboratoires ROUSSEL qui ont eu l'obligeance de mettre à notre disposition un lot important de PÉNICILLINE G.

Streptomycine à 100, 1.000, 10.000 γ/cm^3.
fraîchement préparées ou conservées à la glacière depuis moins de 10 jours.

Technique :

1° dans le but d'opérer, pour tous ces dosages, sur un nombre de germes à peu près comparables on effectue une dilution au 1/100 en bouillon ordinaire de la culture de 24 heures de la souche à tester (on porte deux gouttes de la culture dans un tube de 10 cm^3 de bouillon).

2° On ensemence le milieu « glucose-P. S. P. » avec cette dilution au 1/100 (dix gouttes pour 10 cm^3 de milieu).

3° On répartit le milieu ensemencé dans une série de tubes à hémolyse stériles, à raison de 1 cm^3 par tube.

4° On porte 1 cm^3 de la solution antibiotique dans le premier tube. On mélange. On porte 1 cm^3 du mélange dans le deuxième tube et on passe ainsi en série jusqu'à l'avant-dernier tube. Le dernier ne reçoit pas d'antibiotique et sert de témoin.

Lectures :

Les résultats sont lus après 18, 24 et 48 heures d'étuve à 37°.

On apprécie la pousse :

a) *Par le trouble* provoqué par la croissance du germe.
Les tubes troubles témoignent d'une pousse certaine.

b) *Par le virage de l'indicateur coloré :*
Les tubes limpides restés rouges sont considérés comme stériles.
Les tubes troubles et jaunes sont le siège d'une croissance microbienne.
Les tubes roses ou oranges peuvent être le siège d'une bactériostase.
En règle générale, les résultats peuvent être notés après 18 et 24 heures d'incubation à 37°, mais une lecture de confirmation au bout de 48 heures est indispensable pour apprécier

la pousse dans les tubes qui n'ont présenté, en 24 heures, qu'une bactériostase légère.

— **Taux de sensibilité :**

L'index de sensibilité retenu est la moyenne des concentrations du dernier tube resté stérile et du premier tube qui est le siège d'une pousse microbienne.

Nous avons systématiquement, pour toutes les souches isolées, étudié la sensibilité, en partant d'une concentration de pénicilline de 1 unité-Oxford/cm³.

Nous résumerons la technique et les résultats, en prenant comme exemple le staphylocoque-Oxford (tableau IX).

Tableau IX

TECHNIQUE											
Tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Milieu ensemencé (cm3)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Solution antibiotique (1 u. o /cm3)	1 - passage en série 1										0
Taux antibiotique (u. o./cm3.	0,5	0,25	0,12	0,06	0,03	0,016	0,008	0,004	0,002	0,001	0
RÉSULTATS											
24 h.	0	0	0	0	0	+	+	+ +	+ +	+ +	+ +
48 h.	0	0	0	0	0	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
index de sensibilité = 0,024 u.o. cm3											

Lorsque la souche ainsi testée a montré une croissance dans les premiers tubes titrant 0,5 et 0,25 u.o./cm³, un nouveau test a été pratiqué en partant de concentrations antibiotiques supérieures.

— **Critique de la technique :**

Cette méthode de dilution en série, par dédoublement de la concentration antibiotique directement dans le milieu ensemencé, est simple et rapide.

Elle représente une simplification certaine sur la méthode initiale de dilutions en gouttes, proposée par Sureau et sur le test de dilutions en série avec dédoublement de la solution antibiotique en sérum physiologique et l'addition finale du milieu ensemencé.

Nous avons vérifié, par la pratique simultanée de ces méthodes, que la méthode simplifiée, que nous avons utilisée, donne des résultats comparables à condition de partir de concentrations faibles (1 u.o./cm^3 de Pénicilline-100 γ/cm^3 de streptomycine) et de faire un test de contrôle en partant d'une concentration dix fois supérieure, chaque fois que l'inhibition n'a été notée que dans les deux premiers tubes.

D'ailleurs pour éliminer une cause d'erreur tenant à la variation du pouvoir antibactérien de la solution antibiotique, nous avons, chaque fois, effectué comparativement un test de sensibilité avec le staphylocoque-Oxford, en présence de la même concentration d'antibiotique.

Les résultats, que nous avons notés, restent très approximatifs. Leur valeur est liée à celle de la technique utilisée, mais le but de notre étude étant davantage de comparer des taux que de les déterminer de façon précise, ils nous ont paru très suffisants et nous avons pu utiliser cette méthode pour pratiquer plus de 500 tests sur les staphylocoques pathogènes, sans rencontrer de difficultés particulières.

CHAPITRE II

RÉSULTATS

Nous envisagerons successivement, dans ce chapitre, tout d'abord les résultats bactériologiques des staphylocoques isolés du vagin et du rhino-pharynx et ensuite les relations qui peuvent exister entre la sensibilité de ces germes aux antibiotiques et leurs caractères les plus typiques.

A. RÉSULTATS BACTÉRIOLOGIQUES

Si l'on veut schématiser l'aspect bactériologique d'un staphylocoque pathogène pour l'homme, en prenant pour base tous les travaux que nous avons exposés, ce germe doit remplir les conditions suivantes :

— Liquéfier la gélatine;
— Coaguler le plasma;
— Lyser les hématies de lapin ou de mouton;
— Lyser la fibrine;
Fermenter le mannitol;
— Produire, facultativement une entérotoxine.

Ces caractères sont, en général, ceux des staphylocoques dorés, mais ils sont retrouvés pour des staphylocoques de pigmentation différente; ces derniers sont aussi à considérer comme pathogènes pour l'homme.

Nous venons d'exposer les différentes méthodes par lesquelles nous avons étudié ces caractères bactériologiques sur 239 souches de staphylocoques.

Nous allons donner nos différents résultats en classant nos souches de la façon suivante :

1° Les staphylocoques remplissent *toutes* les conditions requises pour être déclarés pathogènes : *staphylocoques à caractères positifs.*

2° *Les staphylocoques à caractères négatifs.*

3° Les staphylocoques chez lesquels *certaines* réactions seulement sont positives : *staphylocoques à caractères intermédiaires.*

1° Les staphylocoques a caractères positifs (pathogènes).

Sur 239 souches isolées dans le vagin et dans le rhino-

pharynx, 57 (23,05 %) remplissent toutes les conditions pour être classées parmi les staphylocoques pathogènes.

Parmi ces 57 souches :

52 sont dorées;

5 sont blanches;

21 sont entérotoxiques;

36 ne le sont pas.

Il y a donc 23 % des souches, isolées de muqueuses en apparence saine, qui sont des staphylocoques dangereux et d'autant plus que leur résistance aux antibiotiques varie suivant les souches, comme nous le verrons plus loin.

TABLEAU X

Gélatine +	Pigment +	Mannitol +	Coagulase +	Hémolysines		Fibrinolysine +	Entérotoxine +	Pénicilline Résistance
				sang de lapin α	sang de mouton α et β			
52/52	doré 52/52	52/52	52/52	48/52	52/52	52/52	19/52	34/52
5/5	blanc 5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	5/5	2/5	3/5

2° LES STAPHYLOCOQUES A CARACTÈRES NÉGATIFS.

Ces staphylocoques sont ceux qui n'ont donné aucune liquéfaction de la gélatine et aucune coagulation du plasma oxalaté.

Sur nos 239 souches, 57 (23,05 %) remplissent ces conditions. Aucune n'est dorée.

Le tableau XI donne les différents caractères de ces germes que la majorité des auteurs, en raison de la non liquéfaction de la gélatine, groupent parmi les *Micrococceæ*.

TABLEAU XI

Gélatine +	Pigment +	Mannitol +	Coagulase +	Hémolysine		Fibrinolysine +	Entérotoxine	Pénicilline Résistance
				sang de lapin α	sang de mouton α			
0/57	57/57	37/57	0/57	33/57	17/57	0/57	0/57	5/57

L'intérêt de cette étude réside dans les faits suivants : toutes ces souches, qu'il est facile de confondre avec les staphylocoques blancs, sont coagulase et entérotoxine-négatives. Mais la fermentation du mannitol et la recherche de l'hémolysine α sont positives, en moyenne, dans 66 à 67 % des cas. Ces deux réactions, pratiquées seules, pourraient donc amener à des erreurs et faire classer ces germes parmi les staphylocoques pathogènes. Elles ne suffiront donc jamais à caractériser une souche de staphylocoque, d'autant plus que la lecture d'une zone d'hémolyse autour de certaines de ces colonies est parfois difficile à interpréter.

Dans la suite de cet exposé, ces souches non liquéfiantes, sans caractères pathogènes, ne figureront plus parmi nos résultats. Nous nous attacherons seulement à l'étude plus poussée des staphylocoques à caractères intermédiaires.

3° Les staphylocoques a caractères intermédiaires.

Ces souches comprennent tous les staphylocoques liquéfiant la gélatine, quelle qu'en soit la pigmentation, dont les caractères figurent dans le tableau XII.

Sur 239 souches isolées, 125 (52,3 %) font partie de ce groupe.

Tableau XII

Gélatine +	Pigment +	Mannitol +	Coagulase +	Hémolysines		Fibrinolysine +	Entérotoxine +	Pénicilline Résistance
				sang de lapin α	sang de mouton α & β			
4/4	doré 4/4	4/4	4/4	2/4	1/4	0/3	0/3	0/4
121/121	blanc 121/121	19/121	14/121	55/121	23/121	5/119	62/112	21/125

Parmi ces 125 souches :

— 4 sont dorées;

— 121 sont blanches.

La proportion est donc exactement l'inverse de celle trouvée pour les souches à caractères pathogènes.

Bien qu'aucune de ces 125 souches ne présente tous les caractères de positivité demandés pour les staphylocoques pathogènes, le tableau XII montre une différence évidente entre les souches dorées et blanches.

Les souches dorées se rapprochent davantage des staphylocoques pathogènes. En effet, ces quatre souches sont coagulase-positives et mannitol-positives. Leur caractère hémolytique est par contre très déficient.

Cette absence d'hémolyse sur gélose au sang pourrait faire penser que la recherche de l'hémolysine α est un test supérieur en valeur aux deux précédents. Mais le pourcentage de ce même caractère hémolytique, pour les souches blanches, est par contre très élevé alors que les réactions de coagulase et de fermentation du mannitol sont le plus souvent négatives pour ces mêmes souches. Comme le dit si justement Cruickshank [32] :

La recherche de l'hémolysine α pour les souches saprophytes, sur plaque de gélose au sang de lapin, ne me semble pas comparable à sa recherche en milieu liquide, car ces mêmes souches peuvent produire une zone claire sur gélose au sang, sans pour cela produire une hémolysine soluble démontrable. »

Donc la recherche de l'hémolysine isolée, nous paraît difficile à interpréter, d'autant plus qu'elle diffère suivant les hématies employées (hématies de lapin deux fois plus sensibles que les hématies de mouton).

Seules les réactions d'hémolyse négatives ont une valeur indiscutable; elles écartent d'une classification tous les staphylocoques non pathogènes.

Le même raisonnement est à faire en ce qui concerne les réactions de coagulase et de fermentation du mannitol.

La production de coagulase constitue presque un test de certitude pour la valeur pathogène ou non des staphylocoques. Sur cette base, nos souches intermédiaires se séparent en :

— 18 *coagulase-positives*, qui se rapprochent des staphylocoques pathogènes (4 dorées, 14 blanches).

— 107 *coagulase-négatives*, qui se rapprochent des staphylocoques non pathogènes (107 blancs).

En définitive, nos 239 souches sont séparées, par l'étude bactériologique, en deux catégories :

— Les souches coagulase-positives, au nombre de 75 (31,3 %) ;

— Les souches coagulase-négatives, au nombre de 164 (68,6 %).

Les souches coagulasé-positives comprennent :

Les staphylocoques à caractères positifs (pathogènes) : 57 souches.

Certains staphylocoques à caractères intermédiaires : 18 souches.

Les souches coagulase-négatives comprennent :

Les staphylocoques à caractères négatifs : 57 souches.

Certains staphylocoques à caractères intermédiaires : 107 souches.

En accord avec les travaux exposés dans la première partie de ce travail, cette distinction nous fait séparer les staphylocoques pathogènes à coagulase-positive des staphylocoques non pathogènes à coagulase-négative.

D'ailleurs cette production de coagulase étudiée, chez nos 75 souches positives, en parrallèle avec les autres recherches bactériologiques, permet des comparaisons intéressantes :

Sur 75 souches coagulase-positives :

— 56 sont dorées, 19 blanches;

— 64 sont α-hémolytiques sur gélose au sang de lapin;

— 61 sont fibrinolytiques;

— 24 sont entérotoxiques.

En ramenant ces chiffres à 100, nous obtenons le tableau suivant (t. XIII), dont les taux se rapprochent considérablement de ceux trouvés, pour des souches coagulase-positives d'origine très variée, par les auteurs déjà cités au cours de cet exposé.

L'étude des résultats apportés par nos souches de staphylocoques, isolés du vagin et du rhino-pharynx, nous conduit à discuter encore certains caractères des staphylocoques pathogènes.

Tableau XIII

	Mannite	Hemolysine	Fibrinolysine	Entérotoxine
Résultats personnels : Sur 100 staphylo. C = (vagin-rhino. pharynx)	88 %	85 %	82 %	33,4 %

Tableau XIV

CHAPMAN (1934) (13) Staphylocoques dorés		100 %		
CRUICKSHANK (1937) (32) Staphylocoques dorés		95 %		
HALLMAN (1937) (57) (nez)	90 à 97 %	67 %		
GILLEPSIE, DEVENISH et COWAN (1939) (50) (nez-peau)	98,2 %	100 %		
CHRISTIE et KEOGH (1940) (29) (lésions-peau)	100 %	90,3 %		
PILLET (1949) (82)	presque unanimité			
Origine pathogène		91 %	88 %	
Origine non pathogène		35 %	45 %	

Si elles n'ont pas une origine pathogène indiscutable ces souches n'échappent pas, cependant, à certains caractères présentés par des staphylocoques d'origine lésionnaire.

La recherche des hémolysines sur gélose au sang de mouton, après incubation à 37°, suivie de réfrigération en glacière (« hot cold lysis » Bigger, Boland et O'Meara) nous a montré que, parmi les 98 souches hémolytiques sur *sang de mouton,* 5 souches étaient β-hémolytiques et 1 $\alpha\beta$-hémolytique.

Ce fait mérite d'être signalé, car il est admis que l'hémolysine β ne serait produite que par des souches d'origine animale et son élaboration, par des souches humaines, exceptionnelle. Cependant, certains bactériologistes ont retrouvé, chez l'homme, des souches produisantt l'hémolysine β, plus ou moins associée à l'hémolysine α (hémolysine $\alpha\beta$) :

	α	β	$\alpha\beta$
Bryce et Rountree [8] (sur 45 souches)	43	0	2
Christie et Keogh [29] (sur 141 souches)	123	0	18

Nos 6 souches β ou $\alpha\beta$ hémolytiques, prélevées sur 6 personnes différentes, n'ont pas la même origine :

Dans le vagin ont été trouvées :

3 β et 1 $\alpha\beta$.

Dans le rhino-pharynx :

2 β.

Toutes ces hémolysines proviennent de souches dorées, mannitol et coagulase-positives. Sur gélose à la fibrine, 5 sur 6 de ces souches se sont montrées *fibrinolytiques*, caractère qui ne s'accorde pas avec les travaux concernant les souches β-hémolytiques. Il est admis, en effet, que de telles souches, ne produisent qu'exceptionnellement la fibrinolysine [82] [84].

Le nombre important de souches, donnant sur le milieu n° 110 de Chapman, une réaction de Stone positive, a retenu notre attention.

Il nous a paru intéressant alors de rechercher si toutes nos souches, gélatinolytiques sur ce milieu de Chapman, déterminaient, après injection chez le chat, un syndrome gastro-intestinal, comme il est de règle lorsque l'on expérimente avec des souches de staphylocoques responsables d'empoisonnements alimentaires (« Kitten-test »).

Nous avons déjà exposé la technique employée. Nous résumons, de nouveau, les caractères des quelques souches testées et les résultats observés (voir p. 91.)

Souche n° 8 :

Entérotoxine (milieu de Chapman)	0
Pigment	blanc
Mannitol	+
Gélatine	+
Coagulase	0
Hémolysine	0
Fibrinolysine	0
Pénicillino-sensibilité	0,016 u.o./cm³

Kitten test : négatif.

Souche n° 237 :

Entérotoxine (milieu de Chapman)	0
Pigment	doré
Mannitol	+
Gélatine	+
Coagulase	+
Hémolysine (sang de lapin)	α
Hémolysine (sang de mouton)	α
Fibrinolysine	
Pénicillino-sensibilité	160 u.o./cm³

Kitten test : Abattement, anorexie pendant 12 heures. *Pas de diarrhée.*

Les deux souches suivantes donnent une *réaction de Stone positive* sur milieu n° 110 de Chapman :

Souche n° 105 :

Entérotoxine (milieu de Chapman)	+
Pigment	blanc
Mannitol	0
Gélatine	+
Coagulase	0

Hémolysine. 0
Fibrinolysine. 0
Pénicillino-sensibilité. . . . . 0,008 u.o./cm³
Kitten test : Aucuns signes généraux; *quelques selles diarrhéiques.*

Souche n° 210 :

Entérotoxine (milieu de Chapman) . . +
Pigment. . . . . doré
Mannitol. . . . . +
Gélatine. . . . . +
Coagulase. . . . . +
Hémolysine. . . . . +
Fibrinolysine. . . . . +
Pénicillino-sensibilité. . . . . 0,045 u.o./cm³
Kitten test : Tableau *typique :* abattement, anorexie, diarrhées, vomissements.

La comparaison des résultats donnés par ces deux dernières souches dites « *entérotoxiques* » (milieu de Chapman) montre une différence fondamentale.

La seule présence d'entérotoxine (souche n° 105) ne coïncide qu'avec des signes gastro-intestinaux minimes, sans atteinte de l'état général.

Par contre, la présence d'entérotoxine, associée à tous les autres caractères pathogènes (souche n° 210), concorde avec une réaction générale d'une intensité très marquée.

Il semble donc, qu'une entérotoxine active, doive provenir d'une souche présentant les autres propriétés toxiques. Celles-ci sont-elles totalement détruites dans la préparation du filtrat de culture entérotoxique ? Leur présence, même en petites quantités, n'expliquerait-elle pas les phénomènes observés ? Que penser, en effet, des résultats observés avec la souche n° 237 ?

Quoiqu'il en soit, il est intéressant de constater que ceci se rapproche de l'opinion de Chapman, qui énonce ainsi les caractères d'un staphylocoque pathogène entérotoxique [24] :

Toutes les souches incriminées dans les empoisonnements ali-

mentaires donnent une réaction de Stone considérable, produisent un pigment doré, coagulent le plasma, fermentent le mannitol, ont toutes les autres propriétés caractéristiques des staphylocoques pathogènes. Nous aurons, d'ailleurs, l'occasion d'indiquer une nouvelle différence entre nos souches dorées et nos souches blanches entérotoxiques sur milieu de Chapman, au cours de l'étude de leur sensibilité aux antibiotiques.

Sans rien enlever à l'importance de la coagulase, comme moyen de classer nos souches staphylococciques en pathogènes ou non pathogènes, la notion de pigmentation nous a paru mériter un certain intérêt.

Il est classique de lui accorder une valeur secondaire, en tant que caractère pathogène, depuis que l'on a observé que les staphylocoques, dorés ou blancs, provenant de lésions spécifiques, présentent des caractères bactériologiques identiques.

Au cours de notre travail, nous avons étudié la pigmentation de chacune des souches par rapport aux caractères pathogènes présentés. Nous donnons, dans le tableau XV, chaque résultat exprimé par rapport, d'une part à 100 souches dorées, d'autre part à 100 souches blanches.

Tableau XV

	Mannitol +	Coagulase +	Hémolysine	Fibrinolysine +	Entérotoxine +
Staphylocoques dorés	100 %	100 %	94,6 %	90,9 %	29 %
Staphylocoques blancs	19 %	15 %	47,6 %	8,1 %	57,1 %

De ce tableau ressort nettement :

— L'énorme supériorité des staphylocoques dorés, qui présentent tous les caractères, dans une proportion de 90 à 100 %, l'entérotoxine mise à part.

— Les pourcentages assez faibles des staphylocoques blancs, sauf en ce qui concerne la production d'hémolysine sur gélose au sang et d'entérotoxine sur milieu de Chapman.

Ces résultats ne diffèrent pas de ceux trouvés par les auteurs déjà cités (page 59 et suivantes)

L'isolement d'un staphylocoque doré doit toujours amener à penser qu'il est pathogène; ce que confirmeront les autres recherches de laboratoire. Tandis que l'isolement d'un staphylocoque blanc doit être confirmé par les autres épreuves de laboratoire, avant de classer ce germe parmi les pathogènes.

B. ACTION DES ANTIBIOTIQUES

Nous avons étudié le comportement, en face des antibiotiques habituellement utilisés dans le traitement des staphylococcies humaines, de toutes les souches de staphylocoques que nous avons isolées.

Toutes ces souches ont été testées en présence de la pénicilline. Seules, les souches résistantes à cet antibiotique ont été éprouvées vis-à-vis de la streptomycine.

Action de la pénicilline.

Nous nous proposons d'exposer les résultats des déterminations de pénicillino-sensibilité et de rechercher les rapports qui peuvent exister entre ces taux et les autres caractères de ces souches. L'étude comparée de la sensibilité à la pénicilline avec les caractères pathogènes et l'origine de chacune de ces souches peut, en effet, présenter un grand intérêt, non seulement sur le plan de l'identification bactériologique, mais aussi sur celui de l'épidémiologie et de la thérapeutique des staphylococcies.

Nous nous attacherons essentiellement à l'étude des souches isolées comme appartenant au genre « *Staphylococcus* » et nous éliminerons, par conséquent, de nos statistiques les 57 souches qui ne liquéfient pas la gélatine et qui, pour cette raison, peuvent être classées parmi les « *Micrococceæ* ». Nous avons d'ailleurs noté, que ces souches sont, en général, sensibles à la pénicilline; cinq seulement se sont montrées résistantes et ceci

souligne encore leur intérêt minime sur le plan clinique et bactériologique.

Nous limitant, par conséquent, aux 182 souches de staphylocoques, isolés du vagin et du rhino-pharynx, qui toutes liquéfient la gélatine, nous donnerons les taux fournis par les tests de sensibilité; les chiffres varient suivant les souches, de même rappelons-le, qu'elles ne possèdent pas toutes les mêmes caractères pathogènes.

Chaque souche a d'abord été éprouvée, par la méthode des dilutions en série, en présence d'une solution titrée à 1 unité-Oxford/cm³ de pénicilline. Les concentrations réalisées vont donc de 0,5 à 0,001 u.o./cm³. Après 24 à 48 heures d'incubation à 37°, les concentrations minima inhibitrices sont très variables. Pour certaines souches, dont la croissance est notée en présence de 0,5 u.o./cm³, de nouveaux tests sont pratiqués en présence de concentrations initiales 10, 100, 1.000 fois supérieures.

Nous avons choisi arbitrairement, comme limite de sensibilité pour le dépouillement statistique de nos résultats, la concentration de 0,5 u.o./cm³. Ce seuil est classiquement fixé à 0,20 à 0,25 u.o./cm³ suivant les auteurs, en se basant sur la concentration moyenne de pénicilline réalisée dans le sang avec les posologies habituelles. Le chiffre plus élevé que nous avons adopté nous paraît justifié par la tendance actuelle à utiliser des doses plus considérables et par le fait que l'apport local d'antibiotiques, facilement réalisable au niveau du pharynx ou du vagin, permet d'obtenir, en général, des concentrations antibiotiques plus élevées au contact même du foyer bactérien.

Dans ces conditions, nous plaçant sur le plan pratique de la susceptibilité à l'antibiotique aux concentrations thérapeutiques, nous avons considéré toutes les souches, dont la croissance est inhibée en 48 heures par une concentration inférieure à 0,5 u.o./cm³, comme « *Pénicillino-sensibles* ». Inversement, celles, dont la croissance n'est inhibée que pas des concentrations supérieures ou égales à 0,5 u.o./cm³, comme « *Pénicillino-résistantes* ».

Résultats :

Sur 182 souches testées :

1° 124, soit 68,1 %, sont *Pénicillino-sensibles;*

2° 58, soit 31,3 %, sont *Pénicillino-résistantes.*

Le tableau XVI et le diagramme, qu'il a permis de construire (fig. 2), montrent le groupement de ces souches dans différentes limites de sensibilité.

Tableau XVI

	TAUX DE PENICILLINE (u. o./c m 3)										
	0,001 à 0,005	0,005 à 0,01	0,01 à 0,05	0,05 à 0,1	0,1 à 0,5	0,5 à 1	1 à 5	5 à 10	10 à 50	50 à 100	100 à 500
Nombre de Souches	1	6	89	13	15	4	15	9	14	2	14
Pourcentages	0,5	3,2	48,8	7,1	8,2	2,1	8,2	4,9	7,6	1	7,6

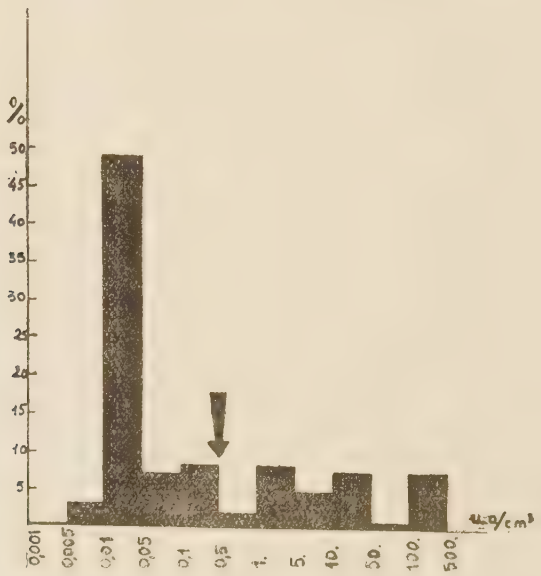


Fig. 2

Il ressort nettement que :

Parmi les souches sensibles, le plus grand nombre se situe entre 0,01 et 0,05 u.o./cm³. Ce cadre, dans lequel figure également le staphylocoque-Oxford (0,03 u.o./cm³), comprend certainement les souches qui, en clinique, se montrent hautement sensibles à la pénicillino-thérapie.

— Les souches résistantes se répartissent de façon assez homogène entre 0,5 et 500 u.o./cm³. Leur proportion notable (31 %) montre bien l'intérêt pratique de la détermination de la sensibilité et soulève le problème angoissant de la fréquence croissante, en clinique, des souches de staphylocoques pénicillino-résistants.

1° Rapport de la pénicillino-sensibilité avec les caractères bactériologiques.

Les résultats bruts de la sensibilité de nos souches de staphylocoques ne donnent qu'une idée imprécise de l'importance de ce caractère.

La pénicillino-sensibilité étant une propriété de la souche et non de l'espèce, il nous a paru intéressant d'étudier les rapports de cette pénicillino-sensibilité avec les autres caractères bactériologiques de chaque souche, et, notamment, avec les caractères pathogènes. Parmi ceux-ci, il en est deux que nous avons retenus :

- La production de coagulase;
- La production d'entérotoxine.

a) **Pénicillino-sensibilité et production de coagulase :** Nous avons déjà vu que la production de coagulase figure parmi les meilleurs caractères pathogènes des staphylocoques. C'est un des plus constants et des plus durables chez une même souche.

Nous avons déjà dit que nous considérions comme pathogènes tous nos staphylocoques « *coagulase-positifs* ». Inversement, tous nos staphylocoques ne présentant pas ce caractère doivent être considérés comme non dangereux.

Dans ce chapitre consacré à l'étude de la sensibilité aux

antibiotiques, nous conserverons la même classification et nous donnerons successivement les résultats de la sensibilité à la pénicilline des souches coagulase-négatives et coagulase-positives :

— Sur 107 souches de staphylocoques coagulase-négatives (fig. 3) :

90, soit 84,1 %, sont sensibles;
17, soit 15,8 %, sont résistantes.

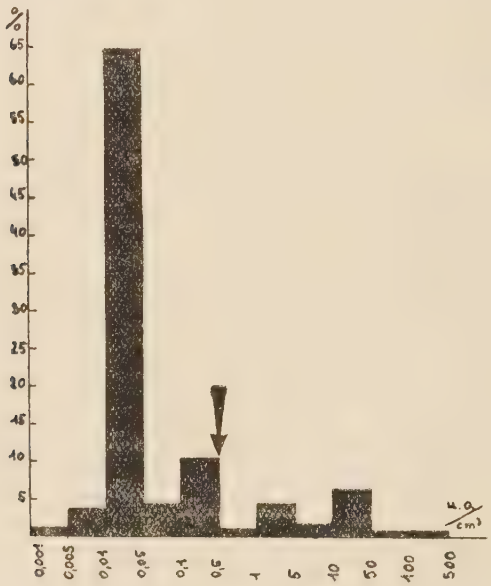


Figure 3.

— Sur 75 souches de staphylocoques coagulase-positives (donc pathogènes) (fig. 4) :

34, soit 46,6 %, sont sensibles;
41, soit 53,3 %, sont résistantes.

FIGURE 4.

Ainsi, plus de la moitié de nos souches coagulase-positives sont résistantes à la pénicilline. Ceci souligne encore l'intérêt en clinique des souches de staphylocoques pénicillino-résistantes.

b) **Pénicillino-sensibilité et production d'entérotoxine** : Nous avons indiqué, en étudiant les caractères bactériologiques de nos staphylocoques,, le nombre important des souches qui donnaient une réaction de Stone positive sur milieu de Chapman. De telles souches, pour mériter la dénomination d' « *entérotoxiques* » doivent, de plus, posséder les caractères des staphylocoques pathogènes, énoncés par CHAPMAN [24] :

Produire un pigment doré;
Fermenter le mannitol;
Coaguler le plasma;
Posséder les autres propriétés caractéristiques des staphylocoques pathogènes.

Nous avons donc recherché s'il existait une relation entre la pénicillino-sensibilité de nos souches de staphylocoques et la propriété de donner une réaction de Stone sur le milieu de

Chapman. Pour ce faire, les germes ont été classés en deux groupes : d'une part, tous les staphylocoques dorés possédant la propriété précédente; d'autre part, les staphylocoques blancs donnant cette réaction de Stone, sans tenir compte de la coagulase.

Dans ces conditions, nous observons les chiffres suivants :

11 sur 16, soit 68,7 % des staphylocoques dorés entérotoxiques, sont pénicillino-résistants.

9 sur 65, soit 13,9 % des staphylocoques blancs donnant une réaction de Stone positive, sont pénicillino-résistants.

Une nouvelle différence sépare donc ces deux catégories de souches entérotoxiques sur milieu de Chapman. Ceux qui possèdent tous les caractères de Chapman : *pigment doré,* mannitol et coagulase-positifs, sont, en majorité, *résistants;* tandis que ceux qui sont également entérotoxiques sur le même milieu, mais sont *apigmentés* et présentent un nombre restreint de caractères, sont en général *sensibles.* Les quelques souches résistantes de ce groupe sont celles qui coagulent le plasma.

2° Rapports de la pénicillino-sensibilité et de l'origine des souches.

Nous donnons, ci-dessous, les résultats bruts de la sensibilité de nos 182 souches, classées selon leur origine :

a) **Provenant du vagin :**

Sur 93 souches isolées du vagin et testées à la pénicilline :
68, soit 73,2 %, sont sensibles.
25, soit 26,8 %, sont résistantes.

b) **Provenant du rhino-pharynx :**

Sur 89 souches prélevées dans le rhino-pharynx : 63 proviennent des sujets hospitalisés, 26 du personnel hospitalier.

Des 63 souches provenant des *sujets hospitalisés :*

45, soit 71,2 %, sont sensibles.
18, soit 28,6 %, sont résistantes.

Au contraire, sur les 26 souches provenant du *personnel hospitalier :*

10, soit 38,6 %, sont sensibles.
16, soit 61,2 %, sont résistantes.

Si l'on ne tient compte que des souches provenant des sujets hospitalisés, on s'aperçoit, que les pourcentages des souches sensibles et résistantes sont à peu près parallèles dans le vagin et le rhino-pharynx.

Par contre, la sensibilité des souches du rhino-pharynx est très différente, si l'on compare les pourcentages de celles provenant des hospitalisées et du personnel hospitalier. Il existe donc là un caractère dont l'importance épidémiologique n'est peut-être pas négligeable.

3° Rapports entre la sensibilité, le caractère pathogène et l'origine des souches.

En résumé, tous les pourcentages donnés précédemment ne prennent une réelle valeur que si l'on envisage simultanément les souches au triple point de vue :

Pénicillino-sensibilité, caractère pathogène, origine.

Pour permettre de mieux comparer ces trois données, nous réunissons tous ces pourcentages en un seul tableau (t. XVII) (fig. 5).

TABLEAU XVII

ORIGINE		CARACTÈRE PATHOGÈNE	ACTION DE LA PÉNICILLINE		Pourcentage des Souches Résistantes
			Sensibles	Résistantes	
VAGIN (93)		Coagulase positives (29)	10	19	65,5 %
		Coagulase — négatives (64)	58	6	9,3 %
RHINO-PHARYNX	HOSPITALISÉS (63)	Coagulase — positives (32)	18	14	43,7 %
		Coagulase — négatives (31)	27	4	12,9 %
	PERSONNEL HOSPITALIER (26)	Coagulase — positives (14)	5	9	64,2 %
		Coagulase — négatives (12)	5	7	58,3 %

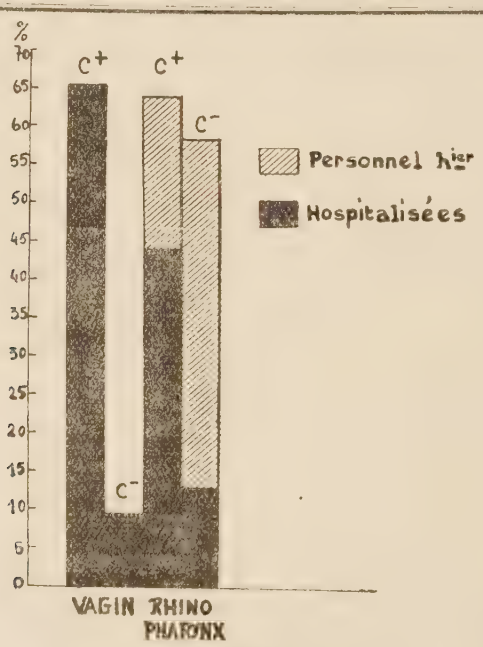


FIGURE 5.

Pourcentage des souches résistantes.

Action de la streptomycine.

Seules, nos souches « *pénicillino-résistantes* » — c'est-à-dire dont la croissance en milieu glucose-P. S. P. n'est pas inhibée, après 48 heures d'étuve à 37°, par une concentration de 0,5 u.o./cm³ — ont été testées vis-à-vis de la streptomycine.

Chaque souche a d'abord été éprouvée, par la même méthode de dilutions en série, en présence d'une solution titrée à 100 γ/cm³. Après incubation à 37°, les lectures, faites au bout de 24 et 36 heures, montrent des concentrations minima inhibitrices variables. Cependant, le taux de 50 γ/cm³ n'a jamais été dépassé.

Nous avons pris comme *limite de sensibilité* le taux de 10 γ/cm³, parce que cette concentration est réalisée, en moyenne, en permanence dans le sang avec la posologie habituelle en clinique (1 gramme à 1 g. 50 par jour, en injections de 0 g. 25 à 0 g. 50).

Dans ces conditions, nous considèrerons comme « *streptomycino-sensibles* » les souches, dont la croissance est inhibée, en 48 heures, par un taux *inférieur* à 10 γ/cm³. Inversement, les souches, dont la croissance n'est inhibée que par des concentrations *supérieures ou égales* à 10 γ/cm³, seront considérées comme « *streptomycino-résistantes* ».

Résultats :

Sur 59 souches testées :

57, soit 96,6 %, sont sensibles.

2, soit 3,3 %, sont résistantes.

Le diagramme suivant donne les résultats intermédiaires (fig. 6).

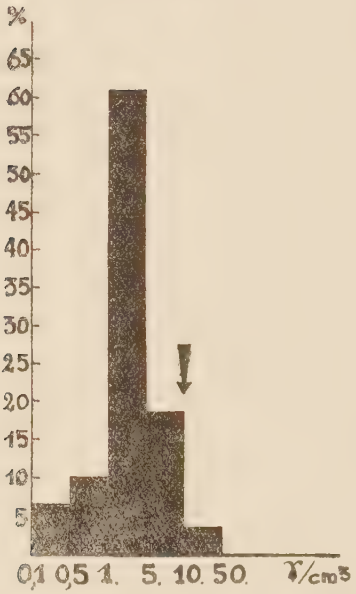


FIGURE 6.

Il ressort nettement que :

— La majorité des souches streptomycino-sensibles se situe à des taux compris entre 1 et 5 γ/cm^3 (staphylo.-Oxford : 1,5 γ/cm^3).

— Le groupe, peu important des souches résistantes est compris entièrement entre 10 et 50 γ/cm^3.

Ces résultats indiquent clairement l'indépendance de la sensibilité d'une souche aux deux antibiotiques : pénicilline et streptomycine. D'ailleurs, les souches, classées d'après leur taux de pénicillino-résistance, se répartissent irrégulièrement dans le diagramme précédent.

Ceci souligne encore l'intérêt pratique du contrôle bactériologique du traitement des staphylococcies par les antibiotiques. La possibilité de traiter efficacement par la streptomycine des souches inaccessibles aux doses usuelles de pénicilline, nous paraît justifier l'étude systématique de la streptomycino-sensibilité des souches pénicillino-résistantes.

CHAPITRE III

TENTATIVES D'INTERPRÉTATION

Après avoir étudié les caractères bactériologiques des souches isolées du vagin et du rhino-pharynx de femmes hospitalisées dans deux services obstétricaux, ainsi que du rhino-pharynx du personnel de ces mêmes services, nous allons comparer à présent les chiffres donnés par ces recherches bactériologiques dans le but de dégager des conclusions épidémiologiques valables.

Nous rappellerons, une fois encore, que nous avons admis, comme pathogènes, tous les staphylocoques coagulase-positifs et que, d'autre part, il existe un nombre élevé de staphylocoques pénicillino-résistants au niveau du vagin et du rhino-pharynx.

Dans ces conditions, nous étudierons successivement le portage de germes staphylococciques chez les hospitalisés au niveau du vagin et du rhino-pharynx, avant et après l'accouchement, en insistant également sur le portage de germes rhino-pharyngés, parmi le personnel hospitalier.

Parmi les sujets hospitalisés, nous étudierons les résultats fournis par celles, au nombre de 97, qui ont eu deux ou plusieurs prélèvements vaginaux : au moins, un *avant* et un *après* l'accouchement. D'autres, au nombre de 55, n'ont eu qu'un prélèvement *avant* l'accouchement. Enfin, 79 femmes, entrées d'urgence, n'ont eu qu'un prélèvement *après l'accouchement*.

Le tableau suivant donne le nombre de porteuses de staphylocoques pathogènes au niveau du vagin (t. XVIII).

Tableau XVIII

Nombre de femmes examinées	Porteuses de staphylocoques pathogènes	
	avant l'accouchement	*après* l'accouchement
97	5	13
55	4	
79		7

Si l'on envisage le pourcentage total de porteuses de staphylocoques pathogènes au niveau du vagin avant et après l'accouchement, on trouve 6 et 11,3 %. Ces chiffres sont très voisins de ceux trouvés par les auteurs déjà cités (Hite et coll.) [60] [61].

Mais, au point de vue épidémiologique, le seul rapport intéressant est celui qui concerne les 97 femmes vues avant et après l'accouchement, parmi lesquelles, le nombre de porteuses de staphylocoques pathogènes a plus que doublé, après un séjour hospitalier variable.

Les cinq souches, isolées, chez les porteuses avant l'accouchement, comprennent une souche pénicillino-résistante. Tandis que, après l'accouchement, sur 13 souches 11 sont résistantes. D'ailleurs, parmi les 13 porteuses de souches résistantes, 8 avaient reçu, avant le deuxième prélèvement, un traitement pénicilliné pour des incidents du post-partum.

Ainsi, le séjour hospitalier semble avoir créé un portage de germes staphylococciques pathogènes, d'autant plus dangereux qu'il s'agit de germes résistants à l'antibiotique le plus employé dans ces services obstétricaux.

Les prélèvements vaginaux ont été accompagnés de prélèvements rhino-pharyngés, chez 72 de ces jeunes femmes. Seule est intéressante la comparaison du portage de germes vaginaux et rhino-pharyngés, chez les femmes qui ont eu ces prélèvements, avant et après l'accouchement (tableau XIX).

Tableau XIX

25 hospitalisées	Porteuses de staphylocoques pathogènes	
	avant l'accouchement	*après* l'accouchement
au niveau du vagin	1	3
au niveau du rhino-pharynx	3	15

Elle révèle que le portage de germes staphylococciques au niveau du rhino-pharynx, qui n'est enrayé par aucuns soins d'hygiène particuliers, se développe bien davantage que le portage de germes vaginal. Le nombre de porteuses de staphylocoques pathogènes rhino-pharyngés est 5 fois plus grand à la sortie (60 %) qu'à l'entrée, et parmi ceux-là 8 sont pénicillino-résistants.

Cette véritable charge en staphylocoques pathogènes que subissent les hospitalisées des services obstétricaux particulièrement surveillés et où le nombre d'infections est bas, nous a paru surprenante. Nous avons cherché quelle pouvait en être la cause et pratiqué, dans ce but, des prélèvements rhino-pharyngés chez tout le personnel hospitalier entourant ces malades. Ce personnel est fixe, composé de sujets sains et éloignés à la moindre indisposition.

Sur 29 personnes, 14, soit 48.2 %, portent des staphylocoques pathogènes, dont 9 pénicillino-résistants.

Le nombre de porteurs, parmi le personnel, est donc beaucoup plus élevé que celui rencontré pour les hospitalisées. Ceci explique peut-être que des femmes, entrées non porteuses, le soient devenues en petit nombre au niveau du vagin, mais en plus grand nombre au niveau du rhino-pharynx.

Un service hospitalier peut donc être une véritable réserve de staphylocoques pathogènes et, caractère plus dangereux, la majorité de ces germes sont pénicillino-résistants.

Malgré l'absence d'identification sérologique des souches que

nous avons isolées, il nous est arrivé *deux fois* de rencontrer des staphylocoques pathogènes, absolument identiques (dans tous leurs caractères bactériologiques et même leur taux de pénicillino-résistance) dans le vagin d'une hospitalisée et dans le rhino-pharynx d'une personne chargée des soins (t. XX).

Cette similitude n'est probablement pas le fait du hasard seul, puisque, dans un cas, il s'agit d'un staphylocoque β-hémolytique, particulièrement rare chez l'homme.

Une autre similitude avait attiré notre attention : trois hospitalisées, voisines de lit, ont présenté les mêmes germes pathogènes dans le vagin, avant l'accouchement (t. XXI).

Leurs suites de couches ont été pathologiques et d'aspect clinique identique :

Quatre à cinq jours après l'accouchement, élévation thermique, avec ascension parallèle du pouls. Aucune cause apparente.

Localement, utérus gros et mou; régression lente. Emission de lochies franchement sanglantes et fétides.

Il est certain que le rhino-pharynx constitue un repaire idéal pour les staphylocoques pathogènes, en raison de sa constitution anatomique, qui rend encore plus difficile les phénomènes locaux de défense ou les tentatives de stérilisation thérapeutiques.

Le vagin, par contre, possède des moyens de défense locaux, très élevés chez la femme adulte saine et principalement au cours de la grossesse. Nous avons donc pensé à rechercher s'il existait, chez les porteuses de staphylocoques pathogènes que nous avons examinées, des perturbations de ces facteurs de défense, qui puissent expliquer, *en partie*, cette contamination.

C'est pourquoi, nous avons étudié systématiquement les caractères biologiques du vagin chez les 72 femmes, qui ont eu des prélèvements vaginaux et rhino-pharyngés en vue de la recherche des staphylocoques pathogènes.

Les caractères biologiques du vagin sont très bien connus, à l'heure actuelle, et il serait en dehors de ce travail de les

Origine de la souche		Gélatine	Pigment	Mannitol	Coagulase	Hémolysine		Fibrinolysine	Entérotoxine	Pénicilline Sensibilité	Streptomycine Sensibilité
						sang de lapin	sang de mouton				
(235) Membre du personnel	Rhino pharynx	+	doré	+	+	α	α	+	0	6 u.o./cm³	3 γ/cm³
(29) Sujet hospitalisé	Vagin	+	doré	+	+	α	α	+	0	6 u.o./cm³	3 γ/cm³
(224) Membre du personnel	Rhino pharynx	+	doré	+	+		β	+	0	1,6 u.o./cm³	2,4 γ/cm³
(25) Sujet hospitalisé	Vagin	+	doré	+	+		β	+	0	1,6 u.o./cm³	2,4 γ/cm³

TABLEAU XX

Sujet Hospitalisé	N° de la Souche	Gélatine	Pigment	Mannitol	Coagulase	Hémolysine		Fibrinolysine	Entérotoxine	Pénicilline Sensibilité
						sang de lapin	sang de mouton			
N° 32	186	+	blanc	+	+	α	0	+	+	0,006 u.o./cm³
N° 33	188	+	blanc	+	+	α	0	+	+	0,006 u.o./cm³
N° 34	191	+	blanc	+	+	α	0	+	+	0,006 u.o./cm³

TABLEAU XXI

exposer ou d'en discuter la valeur. Nous donnons une bibliographie particulière des travaux que nous avons pu nous procurer et nous ne ferons que schématiser rapidement ces caractères avant de les grouper sous forme de tableau.

D'une manière générale, il est maintenant admis que les caractères biologiques du vagin normal sont régis par les hormones ovariennes, pendant toute la période de maturité sexuelle chez la femme, parallèlement au cycle ovarien. De plus, il a été établi d'une façon à peu près certaine, que les substances œstrogènes sont les facteurs primaires responsables de *la prolifération de l'épithélium vaginal*. Il est nettement prouvé que, chez la femme, ces mêmes substances prennent part au *dépôt du glycogène* dans les cellules épithéliales vaginales, à la *réaction acide du milieu* et à la *détermination de la flore vaginale*.

Pendant toute la grossesse, l'activité œstrogénique est très élevée et tous ces facteurs tendent vers un maximum à mesure que le terme approche. Mais, quelques jours avant l'accouchement, tous ces caractères déclinent rapidement et prennent un aspect qui s'accentuera dans le post-partum : l'épithélium vaginal s'amincit, le glycogène devient rare, l'acidité s'abaisse, la flore vaginale tend à devenir polymorphe (t. XXII).

Tableau XXII

Période	Activité hormonale	Epithélium vaginal	Glycogène	Acidité	Flore
PENDANT la grossesse	+ + + + tend à augmenter	+ + + + de 200 passe à 450 µ	très abondant surtout à la fin	+ + + + de pH 5 passe à pH 4,0	Le bacille de Doderlein tend à prédominer et finit par être le seul germe présent.
QUELQUES jours avant l'accouchement	Déséquilibre	Desquamation massive	Absent de la majorité des cellules	+ + tend vers pH5,5 ou plus	A côté du bacille de Doderlein des germes divers apparaissent : Streptocoques. staphylocoques, entérocoques, colibacilles....
DANS le post-partum	Minimum	Réduit à une seule couche	Absent	Diminue pH6,5 n'est pas rare	Le bacille de Doderlein fait défaut dans la plupart des cas. Flore polymorphe.

Dans ces conditions, nous exposerons surtout les résultats obtenus avant l'accouchement (*). Nous pensons que, dans le post-partum, les conditions particulièrement favorables à la contamination (diminution du glycogène, de l'acidité, absence de bacilles de Doderlein. Lochies alcalines) rendent difficile toute tentative d'interprétation.

Sur 72 femmes :

— 50 ont eu des prélèvements vaginaux avant l'accouchement.

— 22 entrées d'urgence, ont eu un prélèvement après l'accouchement.

Les résultats bactériologiques et biologiques sont réunis dans le tableau XXIII.

D'une manière générale, nous avons retrouvé les images décrites par les différents auteurs qui se sont occupés de cette question. L'étude des caractères biologiques du vagin nous a permis de constater, une fois de plus, l'importance et la régularité de leurs variations au cours de la grossesse.

Dans les jours qui précèdent l'accouchement, les perturbations enregistrées coïncident avec la présence des staphylocoques pathogènes. Chez les 5 porteuses de staphylocoques pathogènes, le glycogène était particulièrement déficient (degré II et I) et la flore très polymorphe. Il aurait été intéressant, sans aucun doute, d'effectuer quotidiennement ces recherches et d'étudier le pouvoir pathogène des autres germes présents, associés ou isolés.

•

En résumé, l'étude des caractères biologiques du vagin entreprise pour rechercher les causes de contamination vaginale

(*) Nous avons étudié les caractères biologiques du vagin par les méthodes classiques :

— Les frottis vaginaux par la méthode simplifiée de Shorr.

— La recherche du glycogène vaginal par la méthode des vapeurs d'iode (Mack) et les résultats ont été classés selon les IV degrés de Mack.

— Mesure de l'acidité à l'aide d'un Ionoskrib; mais cette méthode a été abandonnée pour son manque de précision dans certains cas (sécrétions rares ou teintées. Présence de sang).

— La flore vaginale a été étudiée, en dehors de l'isolement des staphylocoques pathogènes, par examen microscopique après coloration de Gram et classée selon les III degrés de Schroder.

individuelle par les staphylocoques pathogènes, chez des femmes enceintes, montre que la période précédant l'accouchement semble être la plus favorable. Ceci souligne davantage les chances courues par les hospitalisées d'être contaminées soit par elles-mêmes, soit par un membre du personnel hospitalier. Le danger représenté par le rhino-pharynx comme réservoir de germes pathogènes n'est diminué en rien, par ce qui précède, bien au contraire.

TABLEAU XXIII

Période	Aspect des frotis	Glycogène	Flore	Nombre de porteuses de staphylocoques	
				non pathogènes	pathogènes
Pendant les derniers mois de la grossesse	Nombre important de cellules basophiles de de la couche superficielle. De la couche intermédiaire à noyau allongé (cellules naviculaires) en nombre très faible mucus et leucocytes plus abondants	Degré III 12/22 Degré IV 10/22	Degré II 13/22 Degré I 9/22	18/22	0/22
Dans les jours qui précédent l'accouchement	Apparition de cellules éosinophiles Mucus et leucocytes plus abondants	Degré III 39/50 Degré II 7/50 Degré I 4/50	Degré II 46/50 Degré III 4/50	(1) 45/50	5/50
Dans le post partum	Abondance de cellules de la couche basale Leucocytose présence d'hématies	Degrés II 12/72 Degré I 60/72	la flore du degré III prédomine	(1) 62/72	10/72

(1) Dans ces chiffres ne sont pas compris les porteuses de staphylocoques pathogènes qui, toutes, hébergeaient aussi des staphylocoques non pathogènes.

Conclusions

1° Les recherches modernes ont souligné l'importance croissante des staphylocoques en clinique humaine.

Leur banalité et leur grande fréquence les font désigner habituellement comme des germes à tout faire. Certains sont saprophytes; d'autres, pathogènes, sont susceptibles de provoquer des affections bénignes, mais aussi des affections graves.

2° Cette variété de distribution rend impérieuse la nécessité de discriminer les souches dangereuses des autres.

Ceci est devenu possible grâce aux méthodes modernes d'investigation qui, groupant des propriétés différentes, visent à déterminer biologiquement le pouvoir pathogène des souches.

Les méthodes que nous avons employées nous ont permis de rappeler, après de très nombreux chercheurs, que pour être pathogènes, les staphylocoques doivent :

— Liquéfier la gélatine,
— Coaguler le plasma en 24 heures,
— Lyser les hématies,
— Lyser la fibrine,
— Facultativement, produire une entérotoxine, un pigment ou fermenter le mannitol.

3° Les recherches, que nous avons entreprises, ont groupé 231 femmes, hospitalisées dans deux services obstétricaux.

a) Il existe, à l'état normal parmi des femmes enceintes, des porteuses de staphylocoques pathogènes au niveau du vagin dans la proportion de 6 % ;

b) Ce pourcentage est faible par rapport à celui des porteuses de staphylocoques pathogènes au niveau du rhino-pharynx :

Sur 25 femmes examinées avant l'accouchement, 3 d'entre elles, soit 12 %, étaient porteuses;

c) Après un séjour dans les services hospitaliers, ces pourcentages augmentent et passent à :

11,3 % au niveau du vagin,
60 % au niveau du rhino-pharynx.

d) Enfin, parmi les vingt-neuf membres du personnel hospitalier de ces deux services, 14, soit 48,2 % hébergeaient des staphylocoques pathogènes au niveau de leur rhino-pharynx;

e) En plus du danger représenté par les staphylocoques pathogènes au point de vue clinique et épidémiologique, le fait qu'un pourcentage élevé de ces germes soit résistants à la pénicilline et sensibles à la streptomycine, souligne tout l'intérêt du dosage *in vitro* de l'action des antibiotiques.

En effet :

65,5 % des souches pathogènes isolées du vagin étaient pénicillino-résistantes;

43,7 % des souches pathogènes isolées du rhino-pharynx des hospitalisées étaient pénicillino-résistantes;

64,2 % des souches pathogènes isolées du rhino-pharynx des membres du personnel hospitalier étaient pénicillino-résistantes;

Mais,

96,6 % de la totalité des souches résistantes à la pénicilline étaient streptomycino-sensibles.

f) Les femmes enceintes se contaminent dans les derniers jours de la grossesse. Les méthodes d'investigation usuelles nous ont permis de nous rendre compte du changement notable subi par les caractères biologiques du vagin à cette période.

4° C'est sur le dépistage systématique des porteurs de staphylocoques pathogènes dans une collectivité que repose toute la prophylaxie des épidémies dues à ces germes.

Le Président de thèse, ANDRIEU — *Le Doyen,* LEFEBVRE

Vu et permis d'imprimer

Toulouse, le 18 Avril 1950

Le Recteur, Président du Conseil de l'Université,

DOTTIN

Bibliographie

Nous citerons ici :

1° Les revues générales;

2° Les revues originales que nous avons pu nous procurer concernant :

A. *Les staphylocoques pathogènes :* Bactériologie, recherche en clinique obstétricale, action des antibiotiques.

B. *Les caractères biologiques du vagin.*

1° Revues générales.

1 Curtis (A. H.). — Textbook of gynecology (Saunders, Philadelphie, 1942).

2 Dubos (R. J.). — Bacterial and mycotic infections of man (Lippincott, Philadelphie, 1948).

3 Gastinel (P.). — Précis de Bactériologie médicale (Masson, Paris, 1949).

4 Hauduroy. — Dictionnaire des bactéries pathogènes (Masson, Paris, 1937).

5 Hauduroy. — Microbiologie générale et techniques microbiologiques (Masson, Paris, 1947).

6 Herrel (W. D.). — Penicillin and others antibiotic agents (Saunders, Philadelphie, 1945).

7 Kolmer (J. A.). — Penicillin therapy (Appleton Century, New-York, 1945).

8 Kolmer (J. A.) et Boerner (F.). — Approved laboratory technics (Appleton Century, New-York, 1945).

9 Levaditi (C.). — La Pénicilline et ses applications pratiques (Masson, Paris, 1945).

10 Martin (M.), Nitti (F.), Sureau (B.), Berrod (J.). — La Pénicilline et ses applications cliniques (Flammarion, Paris, 1945).

11 Morin (M.), Nehlil (J.), Pichon (R.). — La Streptomycine (Masson, Paris, 1949).

[12] By Various Authors. — Recent advances in clinical pathology (Churchill, Londres, 1947).

2° Publications originales.

A. *Staphylocoques pathogènes.*

[1] Andrieu (G.), Mme Enjalbert (E.), Monnier (J.). — Le problème de la pénicillino-résistance (*Rev. Méd. Franç.*, 1948, nov.-déc., 391-406).

[2] Barber (M.). — Coagulase positive staphylococci resistant to penicillin (*Journ. of Path et Bact.*, 1947, *LIX*, 373-384).

[3] Bellamy (W. D.) et Klimek (J. W.). — Some properties of penicillin resistant staphylococci (*Journ. of Bact.*, 1948, *55*, 153-159).

[4] Bigger (J. W.), Boland (C. R.), O'Meara (R. A. Q.). — A new method of preparing staphylococcal haemolysin (*Journ. of Path. et Bact.*, 1927, *30*, 271-277).

[5] Blair (J. E.). — The pathogenic staphylococci (*Bact. Rev.*, 1939, *3*, 97-146).

[6] Boivin (A.) et Izard (Y.). — Méthode pour la purification à l'acide trichloracétique des toxines et antitoxines diphtérique, tétanique et staphylococcique (*Compt. rendu Soc. Biol.*, 1937, *124*, 25-28).

[7] Breuseghem (Van). — Coagulation et fibrinolyse du plasma et du fibrinogène par le staphylocoque et sa staphylocoagulase (*Compt. rend. Soc. Biol.*, 1934, *116*, 344-346).

[8] Bryce (L. M.) et Rountree (P. M.). — The production of beta-toxin by staphylococci (*Journ. of Path. et Bact.*, 1936, *43*, 173-189).

[9] Burnet (F. M.). — The production of staphylococcal toxin (*Journ. of Path. et Bact.*, 1930, *33*, 1-16).

[10] Burnet (F. M.) et Freeman (M.). — The process of formol detoxification. Experiments with staphylococcal toxin (*Journ. of Path. et Bact.*, 1932, *35*, 477-493).

[11] Buttiaux (R.) et Brogniart (R.). — Techniques d'isolement des staphylocoques pathogènes. Identification des staphylocoques entérotoxiques (*Ann. Inst. Past.*, 1947, *73*, 830).

[12] Cadness-Graves (B.). — *Lancet*, 1943, *1*, 736, cité in « Recent advances in clinical pathology », Churchill, Londres, 1947.

[13] Chapman (G. H.), Berens (C.), Peters (A.), Curcio (L.). — Coagulase and hemolysin tests as measures of the pathogenicity of staphylococci (*Journ. of Bact.*, 1934, *28*, 343-363).

[14] Chapman (G. H.) et Berens (C.). — Crystal violet agar as a differential medium for staphylococci (*Journ. of Bact.*, 1935, *29*, 437-448).

15 Chapman (G. H.). — Determination of chromogenic property of staphylococci (*Journ. of Bact.*, 1943, *45*, 4, 405-506).

16 Chapman (G. H.). — The incidence of plasma-coagulating staphylococci in the feces of chronic invalids (*The Jour. of Lab. et Clin. Med.*, 1944, *29*, 938).

17 Chapman (G. H.). — The comparative value of human plasma and human whole blood for testing the coagulating power of staphylococci (*Journ. of Bact.*, 1944, *47*, 2, 211).

18 Chapman (G. H.). — The isolation of pathogenic staphylococci from feces (*Journ. of Bact.*, 1944, *47*, 211-212).

19 Chapman (G. H.). — The reliability of bromthymol-blue-lactose agar and Bacto-phenol-red-mannitol agar for the isolation of pathogenic staphylococci (*Journ. of Bact.*, 1944, *48*, 555-557).

20 Chapman (G. H.). — Staphylococci in gastro enterology (*Am. Journ. of Digest. Dis.*, 1945, *12*, 399).

21 Chapman (G. H.). — The value of concentrated human whole blood and agar cultures for testing the coagulating power of staphylococci (*Journ. of Bact.*, 1945, *50*, 2).

22 Chapman (G. H.). — Differences in susceptibility of human blood to coagulation by staphylococci (*Journ. of Bact.*, 1945, *50*, 119).

23 Chapman (G. H.). — The significance of sodium chloride in studies of staphylococci (*Journ. of Bact.*, 1945, *50*, 201-203).

24 Chapman (G. H.) et Domingo (E.). — Application of new bacteriologic methods to the study and control of staphylococcus food poisoning outbreaks (*Journ. of Bact.*, 1946, *51*, 405).

25 Chapman (G. H.). — A single culture medium for selective isolation of plasma-coagulating staphylococci and for improved testing of chromogenesis, plasma coagulation, mannitol fermentation and the Stone reaction (*Journ. of Bact.*, 1946, *51*, 409-410).

26 Chapman (G. H.). — The staphylococci (*Trans. New-York Acad. Sci.*, 1946, *11*, 9, 52-55).

27 Chapman (G. H.). — Advantages of incubation at 30° for the study of staphylococci (*Journ. of Bact.*, 1947, *53*, 365-366).

28 Chapman (G. H.). — An improved Stone medium for the isolation and testing of food poisoning staphylococci (*Food Research*, 1948, *13*, 100-105).

29 Christie (R.) et Keogh (E. V.). — Physiological and serological characteristics of staphylococci of human origin (*Journ. of Path. et Bact.*, 1940, *51*, 189-197).

30 Colbeck (J. C.) et Proom (H.). — Use of dried rabbit plasma

for the staphylococcal coagulase test (*Brit. Med. Journ.*, 1944, Jun. 1).

[31] Cowan (S. T.). — Classification of staphylococci by slide agglutination (*Journ. of Path. et Bact.*, 1939, *48*, 169-173).

[32] Cruickshank (R.). — Staphylocoagulase (*Journ. of Path. et Bact.*, 1937, *45*, 295-303).

[33] Delezenne (C.). — Action leucolytique des agents du groupe de la peptone (*Arch. Physio. Norm. et Path.*, 1898, *10*, 508).

34 Dolman (C. E.). — Ingestion of staphylococcal exotoxin by human volunteers with special references to staphylococcal food poisonning (*Journ. Infect. Dis.*, 1934, *55*, 172-183).

35 Dolman (C. E.), Wilson (R. J.), Cockroft (W. H.). — A new method of detecting staphylococcal enterotoxin (*Can. Pub. Health Journ.*, 1936, *27*, 489-493).

36 Dolman (C. E.) et Wilson (R. J.). — Experiments with staphylococcal enterotoxin (*Journ. Imm.*, 1938, *35*, 13-30).

37 Douglas et Davis. — Puerperal infection (*Am. J. Obst. Gyn.*, 1946, *51*, 352).

38 Dowling (H. F.), Hirsh (H. L.) et O'Neil (C. B.). — Studies on bacteria developing resistance to penicillin fractions X and G in vitro and in patients under treatment for bacterial endocarditis (*Journ. of Clin. Invest.*, 1946, *25*, 665-679).

[39] Evans (J. E.). — Anaerobic fermentation of mannitol by staphylococci (*Journ. of Bact.*, 1947, *54*, 266).

40 Evans (J. E.). — Studies of staphylococci with special references to the coagulase-positive types (*Journ. of Bact.*, 1948, *55*, 793-800).

41 Favorite (G. O.) et Hammon (W. Mc). — The production of staphylococcal enterotoxin and alpha-hemolysin in a simplified medium (*Journ. of Bact.*, 1941, *41*, 305-315).

[42] Foley (G. E.), Wheeler (S. M.), Getting (V. A.). — Food-borne streptococcus poisoning and infection (*Am. Journ. Hyg.*, 1943, *38*, 250-259).

43 Gale (E. F.). — The nitrogen metabolism of gram-positive bacteria (*Bull. of the J. Hopkins Hosp.*, 1948, *88*, 119-175).

[44] Gengou (O.). — Contribution à l'étude des poisons élaborés par les staphylocoques (*Arch. Intern. Méd. Exp.*, 1930, *5*, 633-639).

45 Gengou (O.). — Contribution à l'étude de la lyse des cellules sanguines par la staphylotoxine (*Ann. Inst. Past.*, 1932, *48*, 19-26).

[46] Gengou (O.). — Contribution à l'étude de l'action des staphylocoques sur le plasma oxalaté et sur le fibrinogène (*Ann. Inst. Past.*, 1933, *51*, 14-31).

47 Gerheim (E. B.), Ferguson (J. H.), Travis (B. L.). — Activa-

tion of staphylocoagulase (*Proc. of the Soc. for Exp. Biol. et Med.*, 1947, *66*, 525-527).

48 Gerheim (E. B.), Ferguson (J. H.), Travis (B. L.), Johnston (C. L.), Boyles (P. W.). — Staphylococcal fibrinolysis (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1948, *68*, 246-248).

49 Gernez-Rieux (Ch.), Buttiaux (R.), Mlle Brogniart. — Les toxi-infections alimentaires provoquées par les staphylocoques (*Presse Méd.*, 1947, 565-566).

50 Gillepsie (E. H.), Devenish (E. A.), Cowan (S. T.). — Pathogenic staphylococci (*Lancet*, 1939, Oct., *21*, 870-873).

51 Glenny (A. T.) et Stevens (M. F.). — Staphylococcal toxins and antitoxins (*Journ. of Path. et Bact.*, 1935, *40*, 201-210).

52 Gratia (A.). — Action des microbes sur la coagulation du sang (*Compt. rendus Soc. Biol.*, 1919, *82*, 1245-1247).

53 Gratia (A.). — A propos de la coagulation du plasma oxalaté par le staphylocoque (*Compt. rend. Soc. Biol.*, 1919, *82*, 1247-1250).

54 Gratia (A.). — Action coagulante du staphylocoque sur le plasma hirudiné (*Compt. rend. Soc. Biol.*, 1919, *82*, 1393-1394).

55 Gratia (A.). — Nature et génèse de l'agent coagulant du staphylocoque ou staphylocoagulase (*Compt. rend. Soc. Biol.*, 1920, *83*, 584-585).

56 Gwatkin (R.), Hadwen (S.), Legard (H. M.). — Staphylococcic infections of the bovine udder (*Can. Pub. Health Journ.*, 1936, *27*, 391-400), cité par Blair (J. E.) : The Pathogenic staphylococci [5].

57 Hallman (F. A.). — Pathogenic staphylococci in the anterior nares (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1937, *36*, 789-794).

58 Hammon (W. Mc. D.). — Staphylococcus enterotoxin : an improved cat test, chemical and immunological studies (*Am. Journ. Pub. Health*, 1941, *31*, 1191-1198).

59 Harper (E.) et Conway (N.). — Clotting of human citrated plasma by Gram-negative organisms (*Journ. of Path. et Bact.*, 1948, *60*, 247).

60 Hite (K. E.), Hesseltine (H. C.), Goldstein (L.). — A study of the bacterial flora of the normal and pathological vagina and uterus (*Am. J. Obst. Gyn.*, 1947, *53*, 233-240).

61 Hite (K. E.) et Hesseltine. — Bacteriology of the gynecologic and involuting uterus (*Am. J. Obst. Gyn.*, 1949, *57*, 143-153).

62 Hobbs (B. C.). — A study of the serological type differenciation of the *Staphylococcus pyogenes* (*Journ. Hyg.*, 1948, *46*, 222-238).

[63] Isaacs (A.) et Scouller (J. M.). — Catalase production by Gram positive cocci (*Journ. of Path. et Bact.*, 1948, *60*, n° 1).

64] Juliannelle (L. A.) et Wieghard (C. W.). — Immunological specificity of carbohydrates derived from staphylococci (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1933-34, *31*, 947-949).

[65] Klimek (J. W.), Cavallito (C. J.) et Bailey (J. H.). — Induced resistance of Staphylococcus aureus to various antibiotics (*Journ. of Bact.*, *55*, 139-145).

[66] Knott (F. A.). — Laboratory control of pathogenic staphylococci (in : *Recent Advances in clinical pathology*, Churchill, Londres, 1947) (89-98).

[67] Knott (F. A.) et Blaikley. — The control of Staphylococcus aureus in a maternity department (*Journ. Obst. Brit. Emp.*, 1944, *51*, 386-400).

68] Kourilsky (R.) et Mercier (P.). — Etude sur l'infection staphylococcique chez l'homme. Variations du pouvoir pathogène du staphylocoque suivant son habitat (*Rev. Immunol.*, 1940, *6*, 19).

[69] Kourilsky (R.) et Mercier (P.). — Sur les caractères différentiels des staphylocoques pathogènes et non pathogènes (*Ann. Biol. Clin.*, 1945, *2*, 272-273).

70 Lefèvre de Harric. — Action de la staphylotoxine sur le lapin (*C. R. Soc. Biol.*, 1919, *82*, 1313-1315).

71 Lominsky (I.) et Grossfeld (E.). — An improved direct coagulase test for the rapid detection of Staphylococcus aureus (*Brit. Med. Journ.*, 1948, Jan. 3).

72 Lominsky (I.) et Milne (J. A.). — Heat resistance and filterability of staphylocoagulase (*J. of Path. et Bact.*, 1947, *59*, 516-518).

73 Mac Kee (C. M.) et Houck (C. L.). — Induced resistance to penicillin of culture of staphylococci, pneumococci and streptococci (*Proc. Soc. Exp. Biol. et Med.*, 1943, *53*, 33).

[74] Madison (R.). — Fibrinolytic staphylococci (*Proc. Soc. Exp. Biol. et Med.*, 1935, *35-36*, 33). 209-211).

75 Martin (R.), Chabbert (Y.), Sureau (B.), Demoures (C.). — Les staphylocoques producteurs de pénicillinase (*Presse Méd.*, 1950, *58*, 197-198).

76] Mercier (P.), Pillet (J.). — Les porteurs de germes staphylococciques (*Bull. Acad. Méd.*, 1948, 269).

[77] Mercier (P.), Pillet (J.), Péry (R.). — Pouvoir antigénique de la coagulase staphylococcique (*Ann. Inst. Past.*, 1948, *74*, 148).

[78] Miale (J. B.) et Frye (J. W.). — Standard test for staphylocoagulase activity (*Am. J. Clin. Path.*, 1948, *18*, 95-96).

[79] Monnier (J.). — Contribution à l'étude des « Antipénicillines ». La pénicillinase (*Toulouse, Thèse*, 1948).

[80] Nélis (P.). — Contribution à l'étude de la toxine staphylococcique (*Ann. Inst. Past.*, 1934, *52*, 597-644).

[81] Penfold (J. B.). — Coagulase production by staphylococci on a solid medium (*Journ. of Path. Bact.*, 1944, *56*, 247).

[82] Pillet (J.). — Sur quelques produits élaborés par les staphylocoques pathogènes (*Paris, Thèse*, 1949).

[83] Pillet (J.), Mercier (P.), Péry (R.). — Pouvoir antigénique de la staphylocoagulase (*Ann. Inst. Past.*, 1948, *74*, 150).

[84] Pillet (J.), Mercier (P.), Péry (R.). — Recherches sur la fibrinolysine staphylococcique (*Ann. Inst. Past.*, 1948, *75*, 458).

[85] Rammelkamp (C. H.), Maxon (T.). — Resistance of Staphylococcus aureus to action of penicillin (*Proc. Soc. Exp. Biol. et Med.*, 1942, *51*, 386-389).

[86] Ramon (G.), Boivin (A.), Richou (R.). — Sur l'obtention de la toxine et de l'anatoxine staphylococcique dans un milieu de composition chimique définie (*C. R. Soc. Biol.*, 1938, *207*, 466-468).

[87] Richou (R.). — Sur la coagulation du plasma oxalaté de cheval par la staphylocoagulase (*Rev. Immunol.*, 1949, *13*, n° 3, 162-176).

[88] Schottmuller (H.). — Die puerperale sepsis (*Munch. Med. Wochen.*, 1928, *27*, 1580).

[89] Stone (R. V.). — A cultural method for classifying staphylococci as of the « food poisoning type » (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1935, *33*, 185-187).

[90] Sureau (B.) et Chabbert (Y.). — Titrage biologique de la pénicilline dans le sang, le liquide céphalo-rachidien et les milieux organiques. Application au dosage de la pénicilline et de la streptomycine (*Biol. Méd.*, 1948, *37*, 1-38).

[91] Surgala (M. J.). — A study of the production of staphylococcal enterotoxin in chemically defined medium (*Journ. Inf. Dis.*, 1946, *81*, 97-111).

[92] Surgala (M. J.) et Hite (K. E.). — Production of staphylococcal enterotoxin in chemically defined medium (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1946, *61*, 244-245).

[93] Tillet (W. S.) et Garner (R. L.). — The fibrinolytic activity of hemolytic streptococci (*Journ. Exp. Med.*, 1933, *58*, 485-502).

[94] Valentine (M. B.). — On the rôle of the staphylococcal toxin in infection (*Lancet*, 1936, March, *7*, 526-531).

[95] Veyssière (F.). — Contribution à l'étude de la staphylococcémie d'origine utérine (*Paris, Thèse*, 1928).

[96] Walker (B. S.), Schaffer (N. K.), Derow (M. A.). — Inactivation of staphylocoagulase by trypsin and pepsin (*Science*, 1947, *106*, 2754-347).

[97] Walker (B. S.), Schaffer (N. K.), Derow (M. A.). — The partial purification of staphylocoagulase and the effect of certain presumptive inhibitors upon its plasma-coagulating action (*Journ. of Bact.*, 1948, *56*, 191-194).

[98] Williams (R. E. O.), Harper (G. J.). — Staphylococcal haemolysins on sheepblood agar with evidence for a fourth haemolysin (*Journ. of Path. et Bact.*, 1947, *59*, 69-78).

99 Wilson (G. S.) et Atkinson (J. D.). — Typing of staphylococci by the bacteriophage method (*Lancet*, 1945, May, *26*, 647-648).

[100] Winslow (C. E. A.), Rothberg (W.) et Parsons (E. I.). Notes on the classification of the white and orange staphylococci (*Journ. of Bact.*, 1920, *5*, 145-167).

B. *Caractères biologiques du vagin.*

101 Ayre (J. E.). — Vaginal and cervical cytology in uterine cancer diagnosis (*Am. J. Obst. Gyn.*, 1946, *51*, 742).

102 Boudet (C.). — Frottis vaginaux, techniques nouvelles de préparation (*Gyn. et Obst.*, 1948, *47*, 718).

103 Chatinières (H.). — Contribution à l'étude des micro-organismes du canal génital de la femme (*Paris, Thèse*, 1895).

104 Courrier (R.). — Endocrinologie de la gestation (Masson, Paris, 1945).

105 Cruickshank (R.). — The conversion of the glycogen of the vagina into lactic acid (*Journ. of Path. et Bact.*, 1934, *39*, 213-219).

106 Davis (M. E.) et Hartman. — Changes in vaginal epithelium during pregnancy in relation to vaginal cycle (*J. A. M. A.*, 1935, *10*, 279).

107 Davis (M. E.) et Pearl. — Biology of the human vagina in pregnancy (*Am. J. Obst. Gyn.*, 1938, 35-77).

108 Geist (S. H.) et Salmon (N. J.). — Evaluation of the human vaginal smear in relationship to the histology of the vaginal mucosa (*Am. J. Obst. Gyn.*, 1939, *38*, 392).

109 Gradwohl (R. B. H.). — Cytologic diagnosis by the smear method (*Lab. Dig.*, 1948, May).

110 Halle (J.). — Recherches sur la bactériologie du canal génital de la femme (*Paris, Thèse*, 1898).

111 Kohn (L.), Harris (J.), Hechter (O.). — Sources of error in the detection of ovulation (*Am. J. Obst. Gyn.*, 1942, *44*, 213).

112] Lichtwitz (A.) et Fitoussi (M.). — Les frottis vaginaux (*Sem. Hôp. Paris*, 1947, *23e an. 11*, 687-708).

113] Mack (H. C.). — Vaginal smear method (*Journ. Clin. Endocr.*, 1943, *3*, 169-178).

114] Mack (H. C.). — The glycogen index in the menopause (*Am. J. Obst. Gyn.*, 1943, *45*, 402).

115] Meleney (F. L.). — Bacterial synergism in disease processes (*Ann. Surg.*, 1931, *94*, 961-981).

116] Mileff (A.). — Recherches sur l'histophysiologie normale et pathologique de la muqueuse vaginale (*Lyon, Thèse*, 1939).

117] Neustaeder (T.) et Mackenzie (L. L.). — The comparative value of endometrial biopsies and vaginal smears (*Am. J. Obst. Gyn.*, 1944, *47*, 81-92).

118] Papanicolaou (G. N.). — The sexual cycle in the human female as revealed by vaginal smears (*Am. Journ. Anat.*, 1933, *52 suppl.*, 519-616).

119] Papanicolaou (G. N.). — A general survey of the vaginal smear and its use in research and diagnosis (*Am. J. Obst. Gyn.*, 1946, *51*, 316).

120] Rakoff (A. E.), Feo (L. G.), Goldstein (L.). — The biologic characteristics of the normal vagina (*Am. J. Obst. Gyn.*, 1944, *47*, 467-494).

121] Rubenstein (F. B.). — The vaginal smears, basal body temperature technic and its application to the study of functionnal sterility in women (*Endocr.*, 1943, *27*, 843).

122] Rubenstein (F. B.) et Guterman. — A simple technic for preparing vaginal smears (*Am. J. Obst.*, 1945, *50*, 565-567).

123] Saugrain (J.). — Contribution à l'étude de la flore normale et du bacille de Döderlein (*Montpellier, Thèse*, 1940).

124] Schockaert (J. A.) et Férin (J.). — L'influence des hormones génitales sur la biologie du vagin (*Gyn et Obst.*, 1948, *47*, 421).

125] Schroder (R.). — Zur pathogenese und Klinik des vaginalen fluors (*Z. für Gunak.*, 1921, *45*, 1350-1361).

126] Schuman (W.). — The possible significance of vaginal smears in the diagnosis of certain disturbances of pregnancy (*Am. J. Obst. Gyn.*, 1944, *47*, 808-816).

127] Siddall (R. S.). — Iodine vapor technique versus carbolfuchsin stain for vaginal smears (*Am. J. Obst. Gyn.*, 1944, *47*, 260-264).

128] Steinhorn (S. R.). — The possible role of bacterial synergism in puerperal infections due to anaerobic streptococci (*Am. J. Obst. Gyn.*, 1945, *50*, 63-68).

129] Stieve. — Uber angebliche zyklische veranderungen des Scheindenepithels (*Z. für Gynak.*, 1931, *55*, 194-201).

[130] Weinstein (L.), Wawro (N. W.), Worthington (R. V.), Allen (E.). — The influence of oestrogenic hormone on the H-ion concentration and bacterial flora of the vaginal of the immature monkey (*Yale J. Biol. et Med.*, 1938, *11*, 141-148).

Impr. P. Julia, 2, rue Temponières — Toulouse

Table des Matières

INTRODUCTION 14

PREMIÈRE PARTIE : **LES STAPHYLOCOQUES**

Caractères Classiques 15

Données Modernes 19

CHAPITRE PREMIER : **Caractères Biologiques** 20

I. — Caractères Bactériologiques 20

Coagulase 24

Hémolysines 34

Fibrinolysine 37

Entérotoxine 39

Caractères biochimiques 45

Les milieux usuels d'étude des staphylocoques pathogènes au Laboratoire 48

II. — Caractères Sérologiques 55

CHAPITRE II : **Tentatives de Classification** 59

CHAPITRE III : **Action des Antibitioques** 70

I. — Pénicilline 70

II. — Streptomycine 73

DEUXIÈME PARTIE : **TRAVAUX PERSONNELS** . . . 77

CHAPITRE PREMIER : **Techniques employées** 78

Techniques des prélèvements 78

Cultures 79

Détermination des caractères pathogènes des souches 85

Sensibilité aux Antibiotiques 95

CHAPITRE II : **Résultats** 100

Résultats Bactériologiques 100

Action des Antibiotiques 110

CHAPITRE III : **Tentatives d'interprétation** 121

CONCLUSIONS 129

BIBLIOGRAPHIE 131

TABLE DES MATIÈRES 141